



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**



**CAMPUS DIADEMA**

**BEATRIZ ELIZABETH RODRIGUES**

**N-ACILIDRAZONAS DERIVADAS DE CROMENOS E ESTUDOS  
DE ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**Diadema**

**2018**

**BEATRIZ ELIZABETH RODRIGUES**

**N-ACILIDRAZONAS DERIVADAS DE CROMENOS E ESTUDOS  
DE ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como exigência  
parcial para obtenção do grau de  
bacharel em Farmácia, ao Instituto  
de Ciências Ambientais, Químicas  
e Farmacêuticas da Universidade  
Federal de São Paulo - Campus  
Diadema.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela  
Gonçales Galasse Rando

**Diadema**

**2018**

Rodrigues, Beatriz Elizabeth

*N*-acilidrazonas derivadas de cromenos e estudos de atividade biológica / Beatriz Elizabeth Rodrigues. -- Diadema 2018

73 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Daniela Gonçalves Galasse Rando

1. JAK-STAT 2. *N*-acilidrazonas 3. Cromenos 4. Antitumoral

CCD 570.724

## **AGRADECIMENTOS**

É.. demorou, mas chegou! Hoje é um dia muito especial e emocionante em minha vida. Tenho certeza de que até o final dessa página, um mol de lágrimas já terão escorrido e estarei fazendo “cover de panda”. Lembro do primeiro dia de aula na UNIFESP como se fosse hoje. Ciclo básico, o que seria aquilo? Primeiro dia aula de faculdade e nem chegar no prédio eu sabia. Chegando, dei de cara com quatro horas-aula de física 1, seguindo a tarde por mais quatro horas-aula de geologia. Nos primeiros momentos me perguntei o que estaria fazendo ali, e se tinha escolhido certo. Talvez os maiores responsáveis por eu ter aceitado enfrentar aqueles primeiros momentos de faculdade, foram os amigos que fiz logo na primeira semana. Fiz amizade com biólogos, engenheiros químicos e químicos. Do meu grupo de novos amigos, era a única do curso de farmácia. Em duas semanas, parecia que éramos amigos há anos. Seguimos durante aquele primeiro ano com força. Quem possuía mais habilidade em uma UC, ajudava os outros. Deu bastante certo. Se não fosse os engenheiros, não sei se teria sobrevivido aos cálculos e as físicas, com os biólogos, biologia celular e ecologia ficou mais fácil. Em troca, pude ajudar em química geral, química orgânica e descobri que ali era meu lugar. Obrigada a cada um de vocês, e por estarem até hoje ao meu lado.

Fomos “separados” e o curso de farmácia propriamente dito, iniciou-se. Fiz novos amigos, e encontrei duas capricornianas teimosas que eu não sabia, mas seriam meus braços direito e esquerdo: Thaís Ramos e Carolina Avelino. Obrigada pela amizade e pelo carinho. Sou mais forte ao lado de vocês! Aos poucos, conhecemos Pâmela, Bárbara, Evelyn, Danielle, Thiago e Adriana, viramos amigos, sofredores, cantores, fizemos paródia, enfrentamos o “expresso-da-morte”, o vulgarmente conhecido 31D a caminho do Eldorado. Foi bastante desafiador, mas sobrevivemos aos 5 anos de graduação. Um muito obrigado especial para todos aqueles novos amigos que fiz ao ingressar em novas turmas após o retorno do intercâmbio. Todos vocês têm um espaço imenso no meu coração! Obrigada, amigos e colegas de profissão!

Agradeço imensamente ao laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos, pelo apoio, pelos amigos, pelas risadas, pelas confraternizações e, principalmente, por todo o aprendizado que me foi proporcionado. Um agradecimento especial para a professora Daniela Rando, minha orientadora, mãe nas horas vagas, amiga e futura



colega de profissão. Obrigada por ter me recebido no laboratório de braços abertos em 2014, quando eu nada sabia de química farmacêutica. Obrigada pelo apoio na decisão de ir aos Ciências Sem Fronteiras, e por ter me recebido de volta em 2016 a fim de continuar nossa pesquisa. Não sei se teria conseguido sem você. Obrigada aos professores colaboradores Mariana Lazarini e Luis Felipe Passero pela disponibilidade e empenho nos ensaios biológicos de citotoxicidade pois, sem eles, grande parte deste trabalho seria inviabilizada. Agradeço também à aluna, mestre e amiga, Marina Varela, pois desde a graduação sendo monitora de físico-química, depois em química farmacêutica e mesmo nas festas loucas da UNIFESP, esteve presente dando muita força. Obrigada, florzinha!

Não poderia deixar de agradecer a cada amigo que fiz no intercâmbio aos Estados Unidos. Formamos uma família naquele um ano e meio de convivência! Obrigada por cada almoço brasileiro, pelo apoio que demos uns aos outros enquanto estávamos longe de nossa terra natal, pelas quintas-feiras no RC's, pelas sessões de cinema no NEST e por todas as visitas que fizemos uns aos outros mesmo após retornarmos ao Brasil. Tenho cada um de vocês em meu coração! "Brazilian guys over here!"

Agradeço também a pessoas incríveis que conheci em meu primeiro estágio, na TheraSkin Farmacêutica! Em especial agradeço à "boss-rainha" Carine Dal Pizzol pelos conselhos, apoio, por acreditar nas minhas capacidades e talentos e por ter se tornado uma amiga, colega de profissão e de vida, muito especial!

Finalmente, agradeço à UNIFESP e à banca pela disponibilidade e por contribuir de maneira construtiva ao meu desenvolvimento profissional e pessoal. Foi um caminho árduo, difícil, mas que trouxe inúmeros bons frutos que me acompanharão daqui por diante, todos os dias de minha vida. Obrigada por esses anos de pobre louco, moicano e federal!

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A via JAK-STAT está envolvida na transmissão de informações do meio extracelular para o núcleo. Por meio desta via ocorre a modulação de processos de divisão e diferenciação celular e, assim, sua ativação exacerbada está diretamente vinculada a doenças autoimunes e neoplasias. Na busca de novos compostos antitumorais, derivados *N*-acilidrazônicos como a nifuroxazida, inibidora da JAK, e os cromenos, inibidores de STAT3, são duas classes químicas que têm sido exploradas com resultados promissores. Este trabalho tem por finalidade a síntese e a avaliação biológica de *N*-acilidrazonas cromênicas, híbridos moleculares potencialmente moduladoras de JAK e da ativação de STATs. **OBJETIVOS:** Sintetizar sete derivados *N*-acilidrazônicos cromênicos, caracterizá-los e testá-los frente a linhagens celulares tumorais. **MATERIAL E MÉTODOS:** Os compostos foram sintetizados em três etapas sintéticas partindo-se dos ácidos benzóicos correspondentes, e uma quarta etapa paralela de síntese do aldeído cromênico. O produtos foram, então, enviados para ensaios de citotoxicidade frente a células leucêmicas HEL, via reagente MTT, e frente a macrófagos J774 através de ensaios de oxidação da resazurina. **RESULTADOS:** Das sete moléculas propostas, cinco foram obtidas, caracterizadas e enviadas aos ensaios biológicos. Os ensaios com MTT dos compostos GPQF 302, 303 e 307 demonstraram que estes não foram capazes de inibir a viabilidade das células leucêmicas testadas, evidenciando a não atividade dos três produtos quanto a estas células. Já os ensaios frente a macrófagos J774 mostraram modesta atividade antitumoral, com destaque para o composto GPQF 308. **CONCLUSÃO:** Os resultados mostram que as modificações propostas não foram eficazes para a ação antitumoral dos compostos, evidenciando que a troca do anel 5-nitrofurânico pelo sistema cromênico foi prejudicial para tal atividade. A perda do sistema nitrado ou do próprio grupo nitro poderia explicar estes achados. Este trabalho foi pioneiro do grupo nas pesquisas por novo antitumorais e ajudou a delinear os novos projetos teóricos e práticos que já se encontram em andamento.

**Palavras-chave:** antitumorais; JAK-STAT; *N*-acilidrazonas, cromenos, fármacos híbridos.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** The JAK-STAT pathway is involved in informations transmissons from extracellular medium to the nucleus. Through this route occurs the process modulation for division and cell diferentiation and, thus, its exaggerated activation is directly linked to neoplasias and autoimmunes diseases. In search of new antitumor compounds, *N*-acylhydrazonics derivatives such as nifuroxazide, JAK inhibitor, and the chromenes, STAT3 inhibitors, are two chemical classes which have been explored with promissing results. The purpose of this work is to synthesise and evaluate biologically the chromenes *N*-acylhydrazones derivatives, potentially modulating molecular hybrids of JAK and the activation of STATs. **AIMS:** Synthesize seven chromenic *N*-acylhydrazonic derivatives, characterize them and test them against tumor cell lines. **MATERIAL AND METHODS:** The compounds were synthesized in three synthetic steps starting from the corresponding benzoic acids, and a fourth parallel stage of chromenic aldehyde synthesis. The products were then sent for cytotoxicity assays against HEL leukemic cells, via MTT reagent, and against J774 macrophages through resazurin oxidation assays. **RESULTS:** Of the seven compounds proposed, five were obtained, characterized and submitted to biological assays. The MTT assays of compounds GPQF 302, 303, 304 demonstrated that they were not able to inhibit the leukemic cells viability tested, evidencing the non-activity of this compounds against these cells. However, the assays against J774 macrophages showed modest antitumor activity, especially the compound GPQG 308. **CONCLUSION:** The results show that the structural modifications proposed were not effective to the antitumor activity of the compounds, evidencing the exchange of the 5-nitrofuranic ring for the chromene was prejudicial to such activity. The loss of the nitrated system or of the nitro group itself could explain these findings. This work was pioneer n the research group for new antitumoral compounds and support to delineate the new theoretical and practical projects which are already in progress.

**Key words:** antitumoral; JAK-STAT; *N*-acylhydrazones; chromenes; hybrids drugs.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAS- Acido Acetilsalicílico
- CIS – Proteína-contendo-domínio-SH2-indutível-por-citocina
- COX-2 - Cicloxigenase-2
- DII - Doença Inflamatória Intestinal
- DMF - Dimetilformamida
- IFNs - Interferons
- ILs - Interleucinas
- JAK - Janus Quinase
- KIR - Região Inibidora de Quinase
- MTT – Metil-Tiazol-Tetrazólio
- NFZ - Nifuroxazida
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- REA - Relação Estrutura-Atividade
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- SNC - Sistema Nervoso Central
- SOCS – Supressores de sinalização via citocinas
- STAT – Transdutor de sinal e ativador de transcrição
- POCl<sub>3</sub> - Oxicloreto de Fósforo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
2.1. A VIA JAK-STAT.....	11
2.1.1. VIA JAK-STAT E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS.....	15
2.1.2. VIA JAK-STAT E DOENÇAS AUTOIMUNES.....	17
2.2. NEOPLASIAS.....	19
2.3. NIFUROXAZIDA.....	20
2.4. CROMENOS.....	23
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1.MATERIAL.....	29
4.1.1. Reagentes.....	29
4.1.2. Solventes.....	29
4.1.3.Equipamentos.....	29
4.2. MÉTODOS.....	30
4.2.1. SÍNTESE DE COMPOSTOS ARÁLICOS.....	31
4.2.1.1. Preparação dos ésteres.....	31
4.2.1.2. Preparação das hidrazidas.....	32
4.2.1.3. Preparação do cromeno (3-formilcromona).....	32
4.2.1.4. Preparação das <i>N</i> -acilidrazonas cromênicas.....	33
4.2.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	33
4.2.2.1. Estudos de viabilidade celular.....	33
4.2.2.2. Estudos de citotoxicidade.....	34
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>9. PARECER DA ORIENTADORA.....</b>	<b>66</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é, atualmente, um dos grande problemas de saúde pública enfrentados pela sociedade mundial, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. Acredita-se que o aumento na incidência do câncer na sociedade mundial é devido a alguns fatores de risco, dentre eles, o consumo de alimentos industrializados, a exposição à radiação ultravioleta e poluentes, hábitos perniciosos, como o fumo e o alcoolismo, etc. Frente às mudanças impulsionadas pela industrialização em massa e globalização, os hábitos sociais sofreram intensas alterações que impactaram diretamente no envelhecimento da população mundial, levando à prevalência de doenças crônico-degenerativas, dentre elas as neoplasias. Segundo a Organização Mundial da Saúde, tumores relacionados a pulmões, estômago, cólon e reto são os mais incidentes a nível global (SILVA et al., 2016)

Em termos biológicos, o estudo da origem do câncer envolve diversos fatores e vias bioquímicas de controle de divisão, diferenciação e morte celular. Estas rotas, quando desequilibradas, algumas vezes resultam em processos de proliferação celular acelerada, desorganizada e/ou com produção de células pouco diferenciadas ou alteradas morfológicamente, que caracterizam quadros patológicos conhecidos, em conjunto, como cânceres (GUERRA et al., 2005).

Uma importante via de comunicação extra-intracelular é a via JAK-STAT, a qual se encontra exacerbada em diversos tipos de cânceres. Por meio desta via, proteínas da família STAT, como a STAT3, transmitem o sinal extracelular de citocinas, interferons e interleucinas para o núcleo, regulando a expressão gênica de proteínas envolvidas em crescimento e diferenciação celular (VARELLA; FORTE, 2001).

Por esta razão, esta via tem sido, recentemente, explorada como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Nesta busca, a nifuroxazida, fármaco antimicrobiano utilizado como antidiarreico, foi estudada revelando a capacidade desta molécula em inibir a quinase JAK-2. Este fármaco apresenta em sua estrutura uma região *N*-acilidrazônica a qual é reconhecidamente um grupo privilegiado do ponto de vista químico-farmacêutico medicinal, por apresentar similaridade a ligações peptídicas, e vários pontos passíveis de interações de hidrogênio (WALKER; XIANG; FRANK, 2014).

Outra classe química que também tem demonstrado modular a via JAK-STAT é a classe dos cromenos. Estes, de forma semelhante à nifuroxazida, também demonstraram possuir atividades antitumorais, comprovando-se sua capacidade de inibição das proteínas STAT, particularmente a STAT3. Por serem estruturas de baixa toxicidade e abundantes no reino vegetal, também atraem a atenção de pesquisadores na busca de novas moléculas bioativas (WANG; YANG; LI, 2006).

Frente ao exposto, e considerando-se as atividades observadas para ambas as classes de compostos, a proposta do presente trabalho é sintetizar, caracterizar e analisar biologicamente uma série de análogos híbridos que mesclam em suas estruturas características semelhantes às da nifuroxazida, através da porção *N*-acilidrazônica, bem como às dos cromenos. Tais moléculas, desta forma, poderiam apresentar atividade sinérgica de ação tanto sobre a JAK quinase quanto sobre seus substratos, as proteínas STATs, através dos cromenos. Nesta proposta, a porção cromênica estaria presente em substituição ao anel nitrofurânico da estrutura da nifuroxazida.

Embora existam muitas alternativas terapêuticas farmacológicas para o tratamento do câncer, estas ainda são pouco seletivas e amplamente associadas a efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes. A via JAK-STAT traz a possibilidade de efeitos que já se comprovam na terapêutica, pois já existem fármacos capazes de atuar nesta via que se mostraram efetivos mesmo com alguns efeitos colaterais, mas passíveis de lapidação para remover esses efeitos. Por este motivo, novos fármacos antineoplásicos são continuamente estudados com o objetivo de trazer fármacos mais efetivos e com menos problemas aos pacientes (FONTES, 2008; CONSTANTINESCU; GIRARDOT; PECQUET, 2008)

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 VIA JAK-STAT

O corpo humano é um conjunto de tecidos de alta complexidade e especificidade regulado por inúmeros componentes de cascatas bioquímicas. Dentre os componentes bioquímicos regulatórios estão as conhecidas citocinas, moléculas protéicas responsáveis pela comunicação e sinalização celular durante o desencadeamento de respostas imunes (VARELLA; FORTE, 2001).

Durante estudos de indução genética utilizando interferons, moléculas envolvidas na regulação do sistema imunológico, foi descoberta a via de sinalização JAK-STAT, uma importante via de transmissão de sinais extracelulares para o meio intracelular, modulatória da expressão gênica.

A sigla JAK refere-se à enzima mais importante desta via e provém da denominação de uma classe de enzimas da grande família das quinases conhecidas como Janus Kinase, onde Janus é referência mitológica ao “deus do início e do fim”, o qual possuiria duas cabeças, de forma equivalente à estas quinases que apresentam dois grande domínios de transferência de fosfatos idênticos. Como quinases, estas enzimas utilizam ATP para fosforilar outras proteínas a fim de ativá-las ou desativá-las. Já a sigla STAT significa Signal Transducer and Activator of Transcription, em português, Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição. Estas são proteínas intracitoplasmáticas que, após serem ativadas por fosforilação pelas JAKs, irão adentrar o núcleo celular e modular a expressão e transcrição de outras proteínas envolvidas em crescimento e diferenciação celular (SHUAI; LIU, 2003).

A via JAK STAT é uma das maiores vias envolvidas na comunicação entre o meio extracelular e o núcleo celular e é composta de três elementos principais: os receptores de membrana plasmática, as enzimas da classe das tirosinas quinases, especificamente da família das Janus quinases (JAK), e das proteínas citoplasmáticas do tipo STAT (figura 1) (O'SHEA; PLENGE, 2012).

Os receptores de membrana celular ligam-se às moléculas sinalizadoras do meio externo a fim de tornarem-se ativos. Esse ligantes sinalizadores podem ser hormônios, como a prolactina, a eritropoetina e a leptina, ou proteínas exclusivas de sinalização, como os interferons e as interleucinas (O'SHEA; PLENGE, 2012).

As tirosinas quinases presentes nesta via são responsáveis por fosforilações de proteínas intracitoplasmáticas levando à ativação de várias destes peptídeos. A



família das JAKs apresenta quatro membros, a saber JAK-1, JAK-2, JAK-3 e a tirosina kinase 2 (TYK-2), dentre os quais as JAK-1 e -2 serão de interesse deste trabalho (SHUAI; LIU, 2003).

Finalmente, as proteínas STATs consistem em elementos proteicos intracelulares determinantes para a modulação gênica, e consequentes respostas biológicas.

A rota é ativada pela ligação das moléculas de sinalização ao receptor de membrana celular o qual, em consequência, sofre dimerização produzindo ativação da enzima JAK a ele associada. Esta enzima irá, por sua vez, fosforilar, primeiramente, resíduos de tirosina do domínio SH2 do próprio receptor ativado e, em seguida, as proteínas STATs presentes no citoplasma que, por ocasião da fosforilação do receptor acabam por ligar-se ao mesmo, por meio das tirosinas fosforiladas, aproximando-se das enzimas fosforiladoras. As JAKs utilizam-se, então, de outro ATP para fosforilar as proteínas STATs (FURQAN et al., 2013)

A STAT fosforilada desliga-se do receptor, migra ao citoplasma onde associa-se a outra STAT recém fosforilada formando dímeros capazes de permear o núcleo celular. No núcleo, o dímero STAT irá se ligar a uma região específica do DNA e promoverá a transcrição de sequências particulares, levando à síntese de proteínas geralmente envolvidas em crescimento, proliferação e diferenciação celular (SHUAI; LIU, 2003).

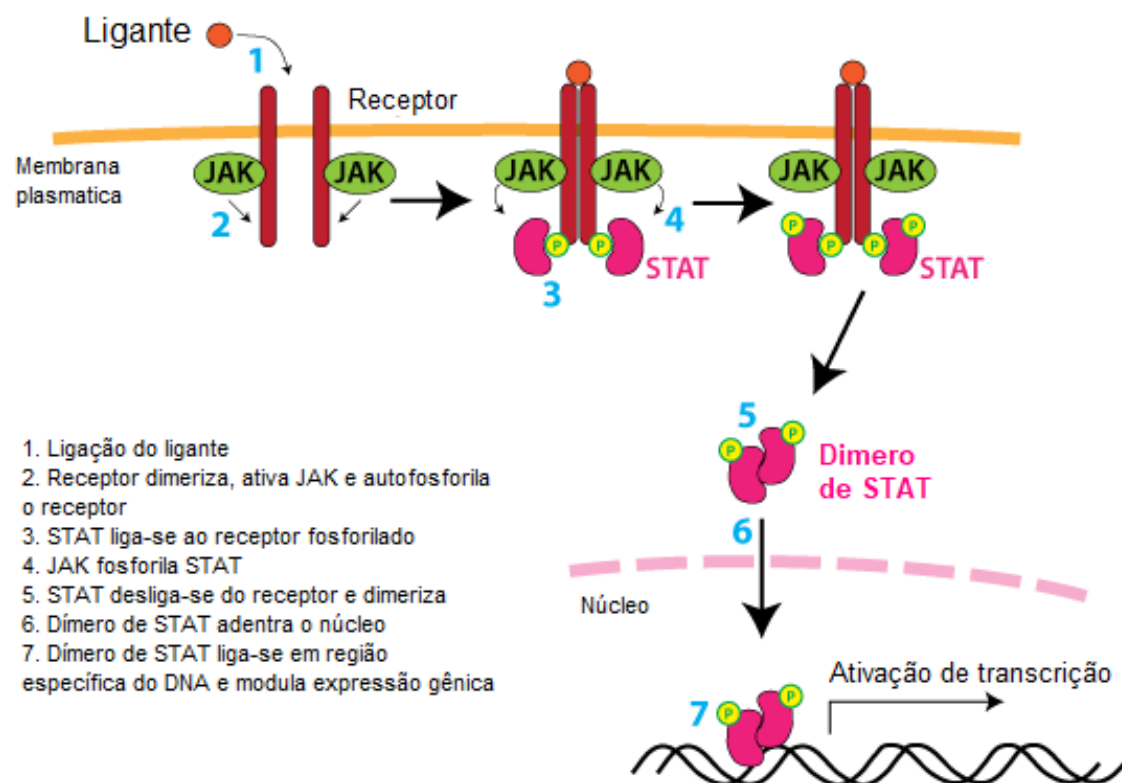


Figura 1: via JAK-STAT (Fonte: adaptado de <<https://courses.washington.edu/conj/bess/jakstat/jakstat.htm>>. Acessado em: 10 de maio de 2018)

As proteínas STAT consistem em sete membros STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b e STAT-6.

Conforme estudos envolvendo as atividades das proteínas STATs foram se desenvolvendo, dois membros da família ganharam notoriedade em razão de seus envolvimento em cânceres e gênese tumoral: STAT3 e STAT5.

Evidências sugerem que, tratando-se de STAT5, essa proteína possui papel importante no desenvolvimento de neoplasias malignas, entretanto, são necessários maiores estudos e comprovação de efetividade por parte das moléculas capazes de bloquear a atividade de STAT5 (PAGE et al., 2012).

Uma complexa cascata de sinalização está envolvida na ativação da STAT5. A ativação desta cascata de sinalização ocorre por meio de estimulação por fatores de crescimento resultando na dimerização do receptor e ativação da proteína STAT5 através da ação das JAKs. Após a fosforilação da STAT5, via resíduos de serina, dímeros de STAT5 são produzidos e enviados ao núcleo celular e, através de sua

ligação a um local específico do DNA, promovam a expressão gênica (PAGE et al., 2012).

Sabe-se, contudo, que conforme a STAT5 é continuamente fosforilada, sua ação nos genes-alvo acaba tornando-se exacerbada, resultando no surgimento de células anormais. Essa ação excessiva das STAT5 e sua dimerização, além de ser responsável por mutar as células, interferem com as proteínas antiapoptóticas, como BCL-XL, conferindo resistência ao organismo em corrigir a mutação. Sendo assim, moléculas capazes de inibir o aumento de ação de STAT5 mostram-se interessantes alvos a serem explorados (PAGE et al., 2012).

De maneira semelhante à STAT5, comporta-se a STAT3, sendo por isto interessante o desenvolvimento de inibidores da expressão exacerbada também desta molécula.

A STAT3 é ativada pela JAK1 por meio da fosforilação da Tyr705 e da Ser727 de sua estrutura. Como a dimerização de STAT3 está relacionada à fosforilação desses dois resíduos presume-se que este fenômeno esteja associado ao desenvolvimento de cânceres e tumores (SIVEEN et al., 2014; CHEN et al., 2008).

Estudos realizados por Fletcher et al. demonstram que há três domínios-alvo relacionados a STAT3: o domínio SH2, o domínio N-terminal, e o domínio de ligação ao DNA. Dentre as três regiões potencialmente alvos, compostos capazes de se ligar ao domínio SH2 parecem ser interessantes e, portanto, têm sido priorizados nos estudos atuais sobre desenvolvimento de inibidores de STAT3, de maneira a promover a inibição da formação dos dímeros de STAT (FLETCHER et al., 2009).

Moléculas capazes de inibir de maneira direta a atividade de STAT3 incluem peptidomiméticos, inibidores desenvolvidos a partir de oligonucleotídeos e moléculas de baixo peso molecular (PAGE et al., 2012).

Em relação ao processo de expressão e modulação gênica, mais estudos em função de STAT3 devem ser conduzidos (GKOUVERIS et al., 2015; KAMRAN et al., 2013). Assim, conhecendo melhor a proteína é possível estudar e desenvolver novos fármacos capazes de interferir na via JAK-STAT.

A significância clínica desta via de sinalização envolve a questão das mutações que podem ocorrer seja por defeitos genéticos ou herdados, responsáveis por interromper ou desregular a funcionalidade da via JAK-STAT.

Sua desregulação pode também estar associada à perda dos mecanismos modulatórios da via. Estudos recentes demonstram que esta via pode ser regulada

de diferentes maneiras. Por exemplo, sabe-se que existem muitos reguladores para esta via, sendo alguns destes reguladores o supressor de sinalização de citocinas (SOCS), as proteínas inibidoras da família STATs ativadas (PIAS), e as proteínas tirosina-fosfatases (PTPs), exercem suas funções por meio de um mecanismo de feedback negativo, ou seja, conforme a transcrição de proteínas é ativada, essas proteínas modulatórias enviam sinais supressores para que a sinalização não se torne exacerbada (Figura 2) (ELLIOTT; JOHNSON, 2004).

Frente à complexidade de modulação desta via, sua importância em processos fisiológicos, participação significativa em processos patológicos e, devido à sua participação cruzada em outras vias de sinalização, a via JAK-STAT se torna um alvo importante de estudos particularmente no que tange à descoberta e o delineamento de fármacos e no entendimento das doenças em si (SHUAI; LIU, 2003).

#### 2.1.1. VIA JAK-STAT E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

O corpo humano, no ambiente em que vive, sujeita-se às mais diversas formas de injúrias, sejam estas por microorganismos invasores ou por danos aos tecidos. Nesse contexto, o organismo passa a reagir de maneira fisiológica com o intuito de impedir maiores danos, resultando em processos inflamatórios, os quais envolvem uma rede complexa de cascatas de eventos, utilização de mediadores, recrutamento celular e mudanças hemodinâmicas (PFITZNER et al., 2004).

Muitos compõem a família das citocinas. Interferons, interleucinas (ILs) e hemopoietinas envolvem uma classe de citocinas que trabalham juntas para controlar os processos inflamatórios. Sabe-se que as citocinas são parte crucial no funcionamento da via JAK-STAT, sendo assim, infere-se que essa via possui algum tipo de papel na engenharia da inflamação. Inicialmente, acreditava-se que a via JAK-STAT era ativada por meio de interferons. Atualmente, este conceito encontra-se melhor desenvolvido, pois é sabido que não só os interferons, mas também fatores de crescimento, citocinas e fatores hormonais podem ativar os componentes JAK e STAT (HANADA; YOSHIMURA, 2002).

Sabe-se, ainda, que a via JAK-STAT possui influência no funcionamento do sistema imunológico. O artigo de revisão de O'shea e Plenge (2012) reporta a relação dos componentes da via JAK-STAT com a sinalização de IL-12, com o funcionamento adequado de IL-4, bem como com a diferenciação de células do tipo

Treg, importantes para tolerância imunológica (não-resposta a um antígeno) (O'SHEA; PLENGE, 2012).

De maneira semelhante, acredita-se que outras proteínas da família das STATs também funcionem de forma a manter a integridade do corpo humano (PFITZNER et al., 2004). Como mediadores de interferons, tem-se as STATs 1 e 2, enquanto que a STAT1 participa da sinalização via interferons dos tipos I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) e II (IFN- $\gamma$ ), STAT2 somente está envolvida com os interferons tipo I. A STAT1, sendo mediadora de ambos os tipos de interferons, participa ativamente das reações inflamatórias, sendo estas de origem viral, bacteriana ou mesmo helmíntica (PFITZNER et al., 2004).

De maneira usual, entende-se que a ativação das proteínas STATs atinge positivamente o organismo, de maneira que este funcione adequadamente. Entretanto, algumas vezes, a ativação exacerbada das proteínas STATs está relacionada a eventos indesejáveis, tais como nos exemplos da ativação exacerbada de STAT1 a qual é identificada em pacientes asmáticos; e nos elevados níveis de STAT3, o qual por diversas vezes têm relação com inflamações crônicas e artrite reumatóide (HANADA; YOSHIMURA, 2002). A fim de controlar qualquer exacerbção na atividade de proteínas STATs, o organismo fisiologicamente equilibrado lança mão de mecanismos de controle reverso da via, ou seja, mecanismos capazes de controlar a perturbação. Neste contexto, insere-se o mecanismo regulatório negativo mediado por proteínas SOCS.

O termo "SOCS" significa Suppressors Of Cytokine Signalling, ou seja, supressores de sinalização via citocinas e correspondem a proteínas que ligam-se a receptores ou a outras proteínas das vias disparadas pelas citocinas de forma a suprimir a sinalização de novos eventos destas vias, em mecanismo conhecido como feedback negativo (YOSHIMURA *et al.*, 2012). São, portanto, reguladores negativos e, há a hipótese de que as SOCS sejam, por sua vez, estimuladas pela presença de citocinas (ELLIOTT; JOHNSON, 2004).

A família das proteínas SOCS é constituída por oito membros, a saber, proteínas CIS (cytokine-inducible SH2 domain-containing protein) SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 e SOCS7. De maneira a entender o comportamento das SOCS no contexto de reações inflamatórias, é necessário entender o mecanismo bioquímico pelo qual elas estão inseridas e suas relações com a via JAK-STAT. Acredita-se que os membros da família SOCS interferem na

via JAK-STAT em diferentes pontos em dependência de seu subtipo. A SOCS1, por exemplo, interfere no domínio SH2 de JAK enquanto que a SOCS3 interfere na cadeia receptora de citocinas; a proteína CIS impede o recrutamento das proteínas STAT, interferindo na dimerização das mesmas e, conseqüentemente, a capacidade destas proteínas em adentrar o núcleo a fim de ativar a expressão gênica (ELLIOTT; JOHNSON, 2004).

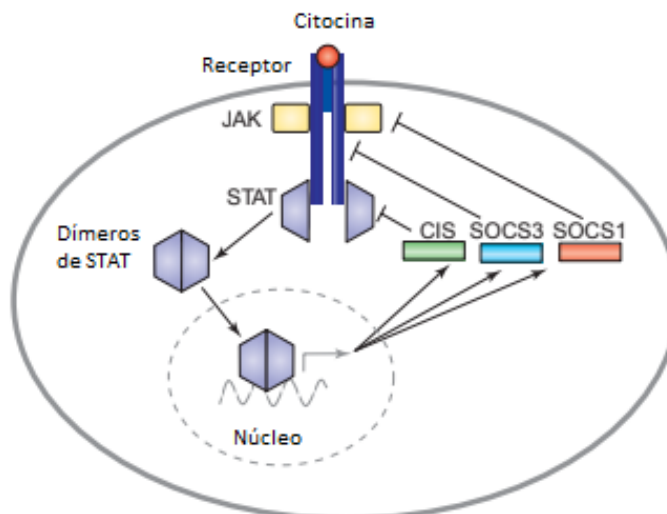


Figura 2: mecanismo de bloqueio de SOCS na via JAK-STAT (Fonte: ELLIOTT; JOHNSTON, 2004)

Com relação às suas características estruturais, as SOCS1 e 3 possuem uma região inibitória da função quinase conhecida como KIR (Região Inibidora de Quinase), cuja função é melhorar a ligação das SOCS na porção quinase das enzimas JAK e mantê-las inibidas, atuando como pseudo-substrato da via. Embora as estruturas de SOCS1 e SOCS3 sejam semelhantes, as atividades da SOCS1 relacionam-se de maneira mais proeminente na regulação da imunidade inata e na apresentação de antígenos. Em termos de inflamação, contudo, a proteína SOCS3 torna-se um melhor exemplo da classe (ELLIOTT; JOHNSON, 2004).

### 2.1.2. VIA JAK-STAT E DOENÇAS AUTOIMUNES

O número de vieses relacionados a uma sinalização anormal tendo como resultado a expressão de autoimunidade são muitos e envolvem diversos fatores. Desses fatores, situações imunológicas e não-imunológicas conferem participação, englobando alterações até a chegada no órgão afetado, ligando-se aos sintomas autoimunes em diferentes doenças (LIANG et al., 2014).

Além do papel inflamatório das citocinas, acredita-se que as mesmas também participem da imunopatogênese de doenças autoimunes, tais como psoríase, lúpus eritematoso, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (DII) (O'SHEA et al., 2013).

Acredita-se que alguns membros da família das proteínas STATs estejam relacionados ao surgimento dessas doenças. As STATs 1 e 2, por exemplo, são responsáveis por proteger o organismo contra infecções virais, bacterianas e parasitárias, de forma que ambas proteínas estão envolvidas na sinalização dos IFNs, sejam eles do tipo I ou tipo II. Entretanto, esses mesmos interferons utilizados para tratar doenças infecciosas podem levar à autoimunidade, como é o caso na artrite reumatóide (PFITZNER et al., 2004).

Outros fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de autoimunidade. Observa-se, por exemplo, que polimorfismos genéticos ligam-se à patogênese das doenças autoimunes. Estudos de Duerr et al., (2006), mostram que a IL-23R, variante da citocina IL-23, possui relação com o risco reduzido de doença inflamatória intestinal e psoríase. De forma similar, outros participantes da via JAK-STAT, como JAK-2, STAT3, IL-6 e STAT4 também possuem interferência em autoimunidade (O'SHEA; PLENGE, 2012).

Acredita-se que proteínas de regulação negativa como as SOCS também teriam influência em doenças autoimunes, porém atuando de maneira protetora. Evidências indicam que SOCS1 e SOCS3 são proteínas importantes para a proteção do organismo em questões autoimunes, interferindo em lúpus eritematoso, artrite reumatóide e psoríase e por meio de diferentes mecanismos (LIANG et al., 2014)

Sendo assim, no contexto das doenças autoimunes, têm-se que a via JAK-STAT participa tanto direta quanto indiretamente. As proteínas SOCS reguladoras negativas da via JAK-STAT, possuem papel de extrema importância na patologia destas doenças e, acredita-se que se tornarão alvos interessantes para a terapêutica. Ainda, compostos sintéticos que consigam mimetizar a função das proteínas SOCS no organismo, regulando negativamente a via exacerbada são, também, potenciais protótipos a serem explorados na busca de novos fármacos na terapêutica de doenças autoimunes (LIANG et al., 2014).

## 2.2. NEOPLASIAS

As neoplasias são resultado da mutação e da proliferação descontrolada das células do hospedeiro. Essas neoplasias podem ser classificadas como benignas, onde o crescimento das células mutadas é lento e, geralmente, bem tolerado, ou malignas, quando as células crescem de maneira rápida e invasiva. No último caso, se não houver intervenção imediata, as chances de sobrevivência do indivíduo podem ser diminuídas. A neoplasia do tipo maligna é conhecida como câncer.

O corpo humano funciona segundo uma rede complexa de conexões entre seus sistemas sendo a regulação desta rede altamente específica. Desta forma, pequenas alterações como substituição, deleção ou adição de um aminoácido (mutações), uma alteração estereoquímica ou alterações no controle de uma via de sinalização podem desencadear alterações catastróficas no funcionamento do organismo.

Como visto, a via JAK-STAT está envolvida na transdução de sinais do meio extracelular para o núcleo da célula, onde, posteriormente, ocorrerão modulações de processos gênicos, como divisão, proliferação e diferenciação celular. Desta forma, mutações nas proteínas constituintes da via podem alterar o funcionamento correto e natural do corpo humano (VARELLA; FORTE, 2001).

Frente a importância desta via de sinalização e sua participação comprovada nos processos neoplásicos, muitos esforços têm sido empreendidos na busca de fármacos capazes de modular ou inibir a via JAK-STAT. Em especial, a STAT3 é dita como dispensável na maioria dos tecidos saudáveis, tornando-a um mediador crítico no que diz respeito à origem de muitos tipos de neoplasias malignas. A ativação de STAT3 depende de muitos fatores, como citocinas envolvidas na sobrevivência de muitas linhagens de célula, como a citocina IL-6. Sendo assim, moléculas capazes de agir inibindo STAT3, tornam-se ligantes promissores. (NELSON et al., 2008).

Além das alterações genéticas diretamente ligadas ao surgimento dos cânceres, existe uma relação entre a inflamação e o desenvolvimento de neoplasias. Desta forma, vias inflamatórias desbalanceadas aumentam o risco do surgimento de câncer. Como já mencionado nas doenças inflamatórias e autoimunes, a redução das proteínas SOCS envolvem-se nessas patologias por aumentarem a regulação das STATs. Novamente, evidências demonstram que SOCS1 e SOCS3 estão



ligadas ao desenvolvimento de patologias, inclusive de neoplasias INAGAKI-OHARA et al., 2013).

Há dados que comprovam que a diminuição da proteína SOCS1 é encontrada em diversos tipos de câncer, incluindo linfoma e leucemia mieloide aguda. Entretanto, o comportamento de SOCS1 irá variar conforme o tipo de tumor em desenvolvimento, associado à presença de citocinas e hormônios. Um exemplo disso é observar que a expressão de SOCS1 torna-se aumentada em células tumorais resistentes a IFNs, ou seja, excesso de SOCS1 pode contribuir para o progresso da doença. Em relação a STAT3, esta encontra-se superativada em uma vasta variedade de células cancerosas. A ativação em excesso é resultado da expressão reduzida de SOCS3, o que acaba contribuindo para a carcinogênese, bem como sua progressão (ELLIOTT; JOHNSON, 2004).

De maneira geral, a redução das proteínas supressoras SOCS1 e SOCS3 é associada ao aumento das proteínas STAT1 e STAT3, devido ao fato de que as SOCS funcionam modulando diversos mecanismos de apoptose. Não havendo o funcionamento correto das SOCS, células defeituosas não são destruídas, aumentando o risco do desenvolvimento de tumores. Sendo assim, acredita-se que moléculas inibidoras das STATs ou estruturalmente semelhantes a SOCS seriam alvos interessantes ao desenvolvimento de novos fármacos (INAGAKI-OHARA et al., 2013)

No início do século 21, foi descoberto o primeiro possível inibidor sintético e específico para interromper a via de sinalização de STAT3, um derivado fosfotirosilpeptídico (TURKSON et al., 2001). A partir de então, compostos, potencialmente promissores foram sendo propostos, mais especificamente, aqueles capazes de inibir a fosforilação de STATs pelas Janus quinases. Moléculas com esse tipo de efeito mostraram-se efetivas, com destaque para a nifuroxazida (NELSON et al., 2008)

### 2.3. NIFUROXAZIDA

A nifuroxazida, derivado *N*-acilidrazônico, é um antimicrobiano sintético com potencial antibiótico, utilizada desde meados de 1960 para o tratamento de diarreias bacterianas. Além disso, este fármaco tem sido amplamente explorado quanto suas potenciais atividades antiparasitárias e antimicobacteriana, bem como seus

análogos estruturais (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2016; RANDO, et al. 2008; RANDO et al. 2002).

Com o aumento da demanda por novos fármacos antineoplásicos, a nifuroxazida foi, juntamente com outros fármacos do mercado, testada frente a células neoplásicas, demonstrando-se seu potencial antitumoral. Em estudos de Walker et al. a nifuroxazida demonstrou ser capaz de reduzir a fosforilação de STAT3 através do bloqueio de JAK-2 e TYK-2, membros da família das Janus quinases, evidenciando o provável mecanismo de ação pelo qual seu potencial antitumoral tornou-se conhecido (WALKER; XIANG; FRANK, 2014).

Em estudo recente conduzido por Nelson *et al.* (2008), a nifuroxazida foi testada de maneira a avaliar a sua capacidade como inibidor de STAT. Neste estudo, as habilidades da nifuroxazida como um potente antitumoral foram testadas, desde a identificação deste fármaco como um inibidor de STAT3 e alvos de inibição, até estudos de viabilidade celular contra células não tumorais, após o tratamento com o fármaco.

Estudos de expressão do gene luciferase reporter de células do tipo U3A mostraram que a nifuroxazida foi potente inibidora de STAT3, visto que tal gene apresenta atividade dependente das funções desta STAT. No ensaio, foi determinado que a nifuroxazida conseguiu inibir a atividade da luciferase dependente de STAT3 com EC<sub>50</sub> de 3 µM (NELSON et al., 2008).

Os autores também investigaram sobre quais alvos da via JAK-STAT a nifuroxazida poderia atuar, sondando particularmente os ligados a STAT3. Incubando o fármaco com células de mieloma, os autores observaram que, em concentração aproximada a 10 µM, houve um decréscimo significativo e rápido na fosforilação de um determinado resíduo tirosina da estrutura da STAT. É sabido que as JAKs ativam as proteínas STAT através da fosforilação de tirosinas do domínio SH2 das STATs, de forma que os resultados destes autores, então, indicam um dos possíveis mecanismos de inibição de STAT3 pela nifuroxazida (NELSON et al., 2008).

Os autores avaliaram, ainda, o nível de bloqueio em JAK-2, TYK-2, JAK-1 e STAT3, utilizando células do tipo INA6 (mieloma múltiplo com STAT3 ativado) e técnicas como imunossupressão. Os resultados indicaram que a nifuroxazida foi capaz de reduzir a fosforilação dos resíduos de tirosina nas STATs em mais de 65%, bem como também reduziu a autofosforilação de JAK-2 e TYK-2. Testes

subsequentes mostraram, ainda, que o fármaco foi específico para inibir JAK-2 e TYK-2. Em paralelo os estudos com células saudáveis não demonstraram citotoxicidade (NELSON et al., 2008).

Quimicamente, a nifuroxazida é constituída de uma porção *N*-acilidrazônica ligada a um sistema nitrofurânico por meio de ligação azometina, constituindo uma base de Schiff (Figura 3).

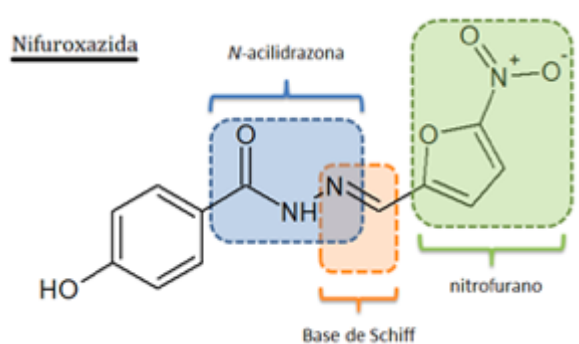


Figura 3: Estrutura química da nifuroxazida e sua constituição químicas

As bases de Schiff são conhecidas como produtos gerados a partir de reações de condensação entre aminas primárias e compostos carbonílicos, estudados primeiramente por Hugo Schiff, em 1864. A estrutura comum dessas bases encontra-se no grupo chamado azometina (Figura 4), onde os grupos R, R1 e R2 podem ser grupos alquil, aril, ciclo-aril e heterocíclicos substituídos. Estudos têm demonstrado que o orbital sp<sup>2</sup> hibridizado no átomo de nitrogênio da azometina possui relevantes atividades químicas e biológicas (SZTANKE et al., 2013).

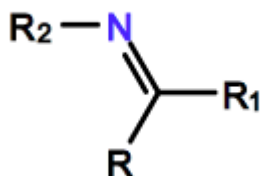


Figura 4: Estrutura química da base de Schiff (ou azometina).

Em um primeiro momento as bases de Schiff chamaram a atenção dos pesquisadores por conta da habilidade dessas bases em atuar como ligantes para íons metálicos, particularmente aquelas obtidas de aldeídos aromáticos orto substituídos (ASHRAF et al., 2011). Porém, logo percebeu-se que essas bases apresentavam interessantes aplicações biológicas, tais como antibacterianas e

antifúngicas. Essas propriedades também estão presentes na porção *N*-acilidrazônica da nifuroxazida.

A porção *N*-acilidrazônica é conhecida pelas suas ações antivirais, antiparasitárias, antimicrobianas, anticonvulsivante, analgésica e antiinflamatória, e antiproliferativa de células tumorais (CACHIBA et al., 2012).

Quimicamente, as *N*-acilidrazonas são compostos orgânicos com estrutura química  $R_1R_2C=NNH_2$ . São conhecidas desde meados de 1850, sendo extensivamente estudadas por conta de suas propriedades promissoras.

A síntese dessas moléculas é relativamente simples, sendo obtidas geralmente por meio de sistema refluxo em poucas horas o que atrai a atenção de pesquisadores no que tange à novos fármacos, visto que simplicidade de síntese se traduzirá, em longo prazo, em fármacos mais baratos e, portanto, acessíveis à população.

Dentre as muitas aplicações biológicas desempenhadas pelas *N*-acilidrazonas, têm-se destaque para as atividades antimicrobianas e antiparasitárias, bem como as recentemente reportadas ações antitumorais (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007; RANDO et al. 2002; RANDO et al. 2008; NELSON et al. 2008; ZHU et al., 2016).

## 2.4. CROMENOS

A origem da palavra "cromeno" é grega e provém de *chroma*, que significa "cor" visto que tais substâncias apresentam coloração, sob espectro de luz visível, variando do amarelo claro ao laranja escuro (GASPAR et al., 2014).

Os cromenos estão presentes no meio ambiente através de plantas, como metabólitos secundários produzidos pelas mesmas. O primeiro cromeno reportado foi extraído de sementes da planta mediterrânea *Ammi visnaga* e, portanto, recebeu o nome de Khellin. Esse cromeno foi utilizado por muitos anos como diurético e relaxante de musculatura visceral, por atuar diretamente em fibras musculares lisas (EDWARDS; HOWELL, 2000).

A abundância dos cromenos no reino vegetal, bem como sua baixa toxicidade, faz com que esses compostos estejam cada vez mais presentes no dia-a-dia da vida humana e, conseqüentemente, sejam mais explorados (WANG; YANG; LI, 2006). Porém, mesmo frente à sua ampla exploração científica, poucas são as moléculas com esta estrutura utilizadas na terapêutica.

Exemplo de cromenos utilizados na terapêutica humana é o Cromoglicato, utilizado como estabilizante de mastócitos para auxiliar no tratamento de doenças inflamatórias, como rinite alérgica e asma. Outro exemplo próximo é o Nedocromil, medicamento utilizado para prevenir sintomas causados por asma (KERI *et al.*, 2014).

Quimicamente, consistem em sistema bicíclico constituído da fusão de um anel benzênico e um anel pirano, sendo assim conhecidos como benzopiranos. Constituem, ainda, um excelente precursor químico para inúmeros derivados, em diferentes níveis de oxidação. Exemplos básicos da classe incluem os cromanos e cromenos, 2-cromenos, 4-cromenos, 3-cromanonas, 4-cromanonas, 2,4-cromadionas, onde a nomenclatura numérica indica o posicionamento de duplas-ligações ou funções químicas acopladas (Figura 5) (ELLIS, 2009).

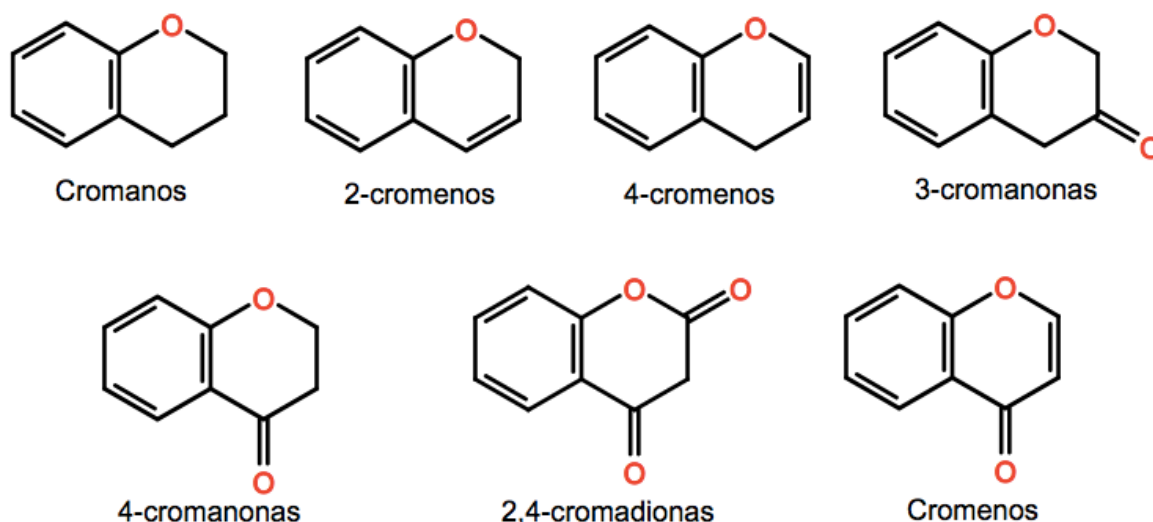


Figura 5: Membros básicos da família cromênica

As estruturas básicas contidas nos cromenos relacionam-os à família dos flavonoides, como as flavonas e as isoflavonas (GASPAR *et al.*, 2014).

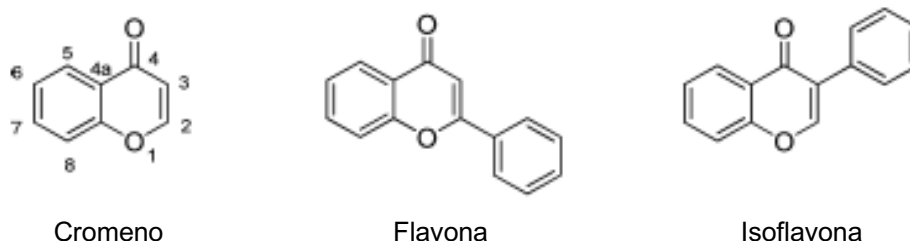


Figura 6: Estruturas químicas básicas dos cromenos e flavonóides (Fonte: GASPAR et al., 2014)

O anel cromênico sintético pode ser obtido por diferentes tipos de reações química orgânicas. Dentre essas, destaca-se a reação de Vilsmeier-Haack. Esta reação ocorre entre um reagente de formilação (ou reagente de Vilsmeier-Haack) e um composto orto-hidroxi-alkil-cetona. A reação ocorre em duas etapas: 1) formação do reagente de Vilsmeier seguida da etapa 2) de ataque nucleofílico do mesmo, seguida de ciclização do sistema por ataque da hidroxila fenólica em posição orto do anel aromático ao carbono mais eletrofílico da estrutura do intermediário reacional **1** (Figura 7). A formilação se completa pela adição de água à mistura reacional, a qual desloca um grupo dimetilformamida do intermediário reacional **2**, levando ao aldeído cíclico **3** (GASPAR et al., 2014).

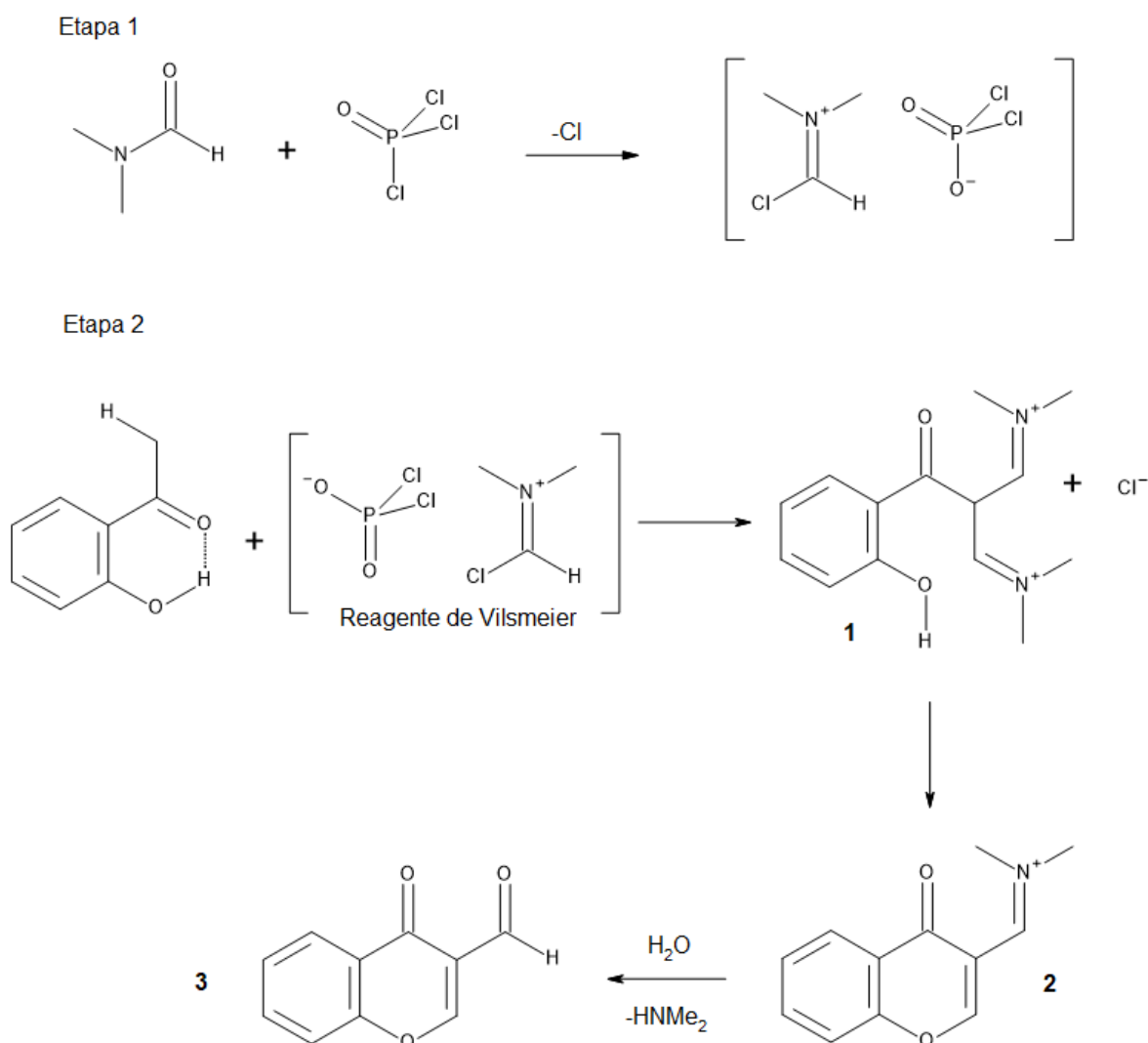


Figura 7: Mecanismo de ação não detalhado de Vilsmeier-Haack

Os cromenos e seus derivados são amplamente explorados por conta de suas potenciais aplicações farmacológicas, como por exemplo, suas atividades antiinflamatórias, antiplaquetárias, antiparasitárias e antitumorais.

No campo do desenvolvimento de novos fármacos antiinflamatórios, os cromenos aparecem como alternativas de moléculas não-esteroides inibidoras seletivas da cicloxigenase-2 (COX-2), ou inibidores da enzima óxido-nítrico sintase, ou ainda, considerando-se outros alvos farmacológicos, como antagonistas dos receptores de leucotrienos, envolvidos na asma (GASPAR et al., 2014).

Derivados acilidrazônicos acoplados à estrutura cromênica foram sintetizados e comparados ao meloxicam (antiinflamatório referência) quanto às atividades antiinflamatórias, resultando que tais cromenos demonstraram maior potência do que o fármaco de referência do estudo (KERI et al., 2014).

Em relação à atividade inibitória sobre os leucotrienos, estudos revelaram um potente composto derivado cromênico baseado na estrutura química do Pranlukast, medicamento utilizado para tratar os sintomas de asma. Este composto demonstrou ser um potente antagonista de leucotrienos D4 por conta do aumento na afinidade pelo receptor de leucotrienos. Sendo assim, os pesquisadores envolvidos no estudo concluíram que o anel cromênico associado ao grupo 2-quinolinil-metil-metóxi-fenil foi responsável pela melhora na afinidade pelo receptor (GASPAR et al., 2014).

No Brasil existe um grande apelo em função das doenças negligenciadas. As doenças negligenciadas são, geralmente, gerando um grande problema de saúde pública em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), pouco mais de 15% da população mundial morre a cada ano afetadas por doenças parasitárias. Dessas doenças, leishmaniose, e Chagas estão entre as mais perigosas para a sociedade, matando milhões de pessoas a cada ano. Por não haver vacinas disponíveis, muitos esforços têm sido realizados em busca de novos fármacos antiparasitários (HAREL et al., 2013).

Nesta busca, os cromenos também tem se mostrado promissores. Descobriu-se que o composto cromeno-diidro-chalchona, em testes, foi capaz de inibir o crescimento de *Leishmania donovani*, causadora da leishmaniose do tipo visceral. Outro exemplo envolveu derivados de cromenos tricíclicos, os quais também demonstraram atividade antileishmania (HAREL et al., 2013).

Os cromenos também demonstraram possuir atividades antiplaquetárias, desempenhando papel importante no aspecto de doenças tromboembolíticas. Neste contexto, muitos são os esforços na busca por moléculas capazes de antagonizar receptores, inibir enzimas ou interferir no processo de agregação plaquetária, como o ácido acetilsalicílico (AAS). Estudos de relação estrutura-atividade (REA) em torno de derivados 2-dietilamino-cromenos e etilamino-cromenos foram testados quanto a habilidade de inibir a agregação plaquetária. Ao analisar a potência dos compostos, muitos demonstraram ser mais potentes e até mais seletivos que o AAS, evidenciando que derivados cromênicos são promissores também em atividades antiplaquetárias (KERI et al., 2014).

Uma das potenciais e atrativas atividades encontradas a respeito dos cromenos são os antitumorais. No campo dos compostos naturais, derivados de plantas, alguns compostos já possuem potencial antitumoral intrínseco, tais como o Tephrosia, para câncer de pulmão, e o Seselin, para tratar câncer de pele (THOMAS; ZACHARIAH, 2013).

O mecanismo de ação melhor abordado na literatura e também o mais promissor, é aquele ligado à tubulina. Compostos direcionados à inibição da polimerização da tubulina têm sido os mais estudados, por conta de seus potenciais pró-apoptóticos e capacidade de ligar-se nos diferentes sites da proteína. Sendo assim, moléculas derivadas de 4-aril-4H-cromeno vêm mostrando eficácia como inibidores de microtúbulos, bem como alterações estratégicas no grupo arílico demonstram melhorar a atividade biológica (THOMAS; ZACHARIAH, 2013).

No contexto do presente trabalho, acredita-se que os cromenos possuam a habilidade de ligar-se ao sítio de fosforilação de STAT através de JAK e, sendo assim, seria capaz de interferir na via JAK-STAT e bloquear a ativação de STATs ligadas ao surgimento de tumores (MULLER et al., 2008).

Por fim, acredita-se que o anel cromênico possui atividades promissoras, visto esta estrutura química estar presente em uma vasta gama de moléculas e ser capaz de interagir facilmente com receptores. Estudos mais aprofundados, contudo, ainda devem ser conduzidos em prol do desenvolvimento de novos fármacos.



### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho envolve a síntese de sete compostos *N*-acilidrazônicos derivados de cromenos (figura 8), de forma a estudar sua potencial ação antitumoral *in vitro* bem como suas características estruturais.

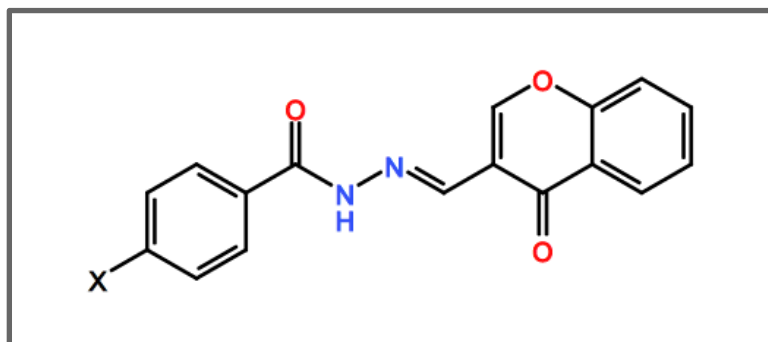


Figura 8: núcleo-base a ser sintetizado

Os objetivos específicos envolvem:

- Sintetizar sete ésteres etílicos derivados de ácido benzóico e suas respectivas hidrazidas.
- Sintetizar o aldeído cromênico a ser utilizado na etapa final como reagente.
- Sintetizar sete compostos derivados *N*-acilidrazônicos cromênicos.
- Caracterizar estruturalmente cada um dos compostos e intermediários obtidos por síntese por meio de técnicas como, ressonância magnética nuclear, espectroscopia de massas e infravermelho.
- Avaliar biologicamente a atividades dos compostos finais por meio de ensaios de citotoxicidade via emprego do reagente de viabilidade celular MTT, bem como atividade antiproliferativa em macrófagos J774.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Reagentes

- Acetofenona
- Ácido 4-clorobenzóico
- Ácido 4-etilbenzóico
- Ácido 4-hidroxibenzóico
- Ácido 4-metilbenzóico
- Ácido 4-metóxibenzóico
- Ácido 4-terc-butilbenzóico
- Ácido benzóico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Bicarbonato de sódio
- Éter etílico
- Hidrazina 85% (p/v) em água
- *N,N*-Dimetilformamida (DMF)
- Oxicloreto de fósforo
- Pentóxido de fósforo
- Sulfato de sódio

#### 4.1.2. Solventes

- Acetato de etila
- Etanol
- Dimetilsulfóxido-deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>)

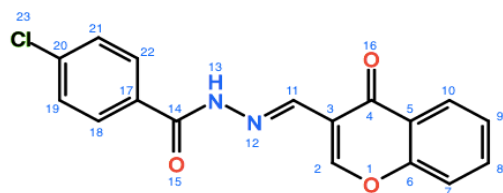
#### 4.1.3. Equipamentos

- Ressonância Nuclear Magnética - Bruker DPX300 300 MHz

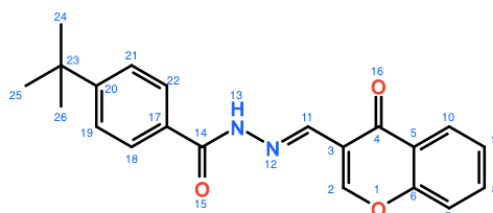
- Infravermelho – IR Affinity-1 Shimadzu
- GC-LRMS - Shimadzu modelo QP2010 Plus
- Equipamentos básicos para síntese orgânica como rotaevaporador, agitadores magnéticos e bomba de alto vácuo.

#### 4.2. MÉTODOS

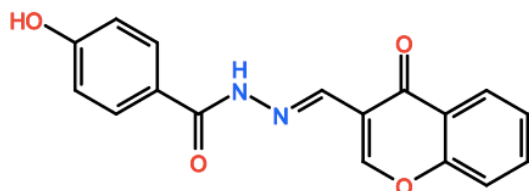
O trabalho foi desenvolvido com vistas a explorar as seguintes modificações moleculares na estrutura base abaixo:



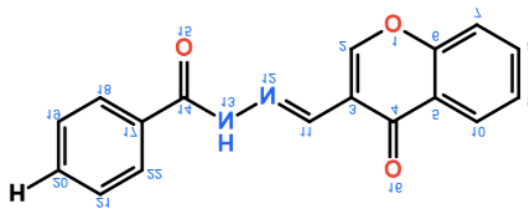
**GPQF 302**



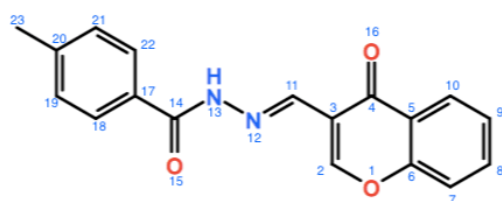
**GPQF 303**



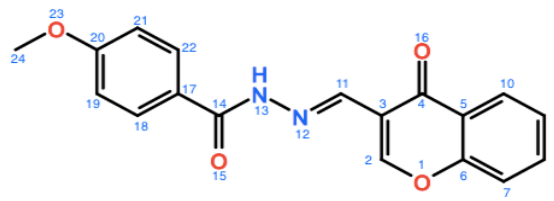
**GPQF 304**



**GPQF 305**



**GPQF 307**



**GPQF 308**

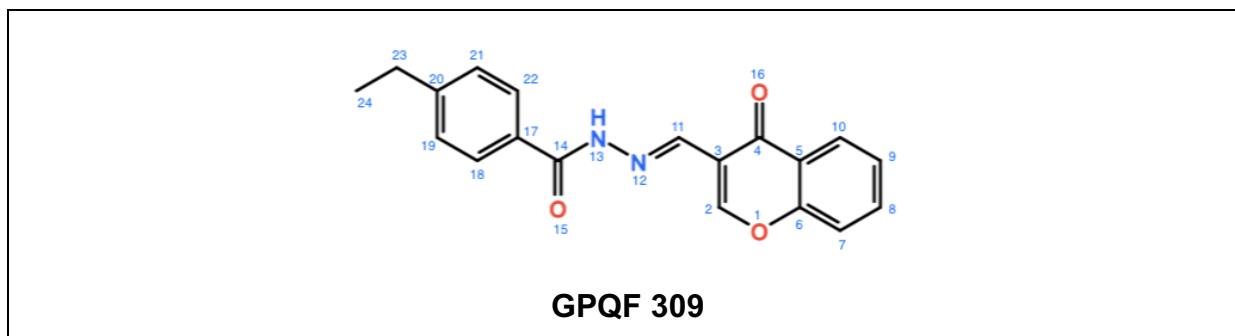


Figura 9: Série de moléculas híbridas proposta.

Para a obtenção desta série análoga, foram planejadas as sínteses de sete compostos em quatro etapas sintéticas. Primeiramente, foram sintetizados os sete ésteres etílicos por meio de esterificação de Fischer. Em seguida, os ésteres foram utilizados como reagente na síntese das hidrazidas. Paralelamente foi realizada a obtenção do aldeído cromênico por meio de uma reação de Vielsmeier-Haack. Como etapa final, hidrazida e aldeído cromênico são condensados em reação de adição à carbonila do aldeído seguida de eliminação de uma molécula de água.

#### 4.2.1. SÍNTESE DE COMPOSTOS ARÍLICOS

##### 4.2.1.1. Preparação dos ésteres

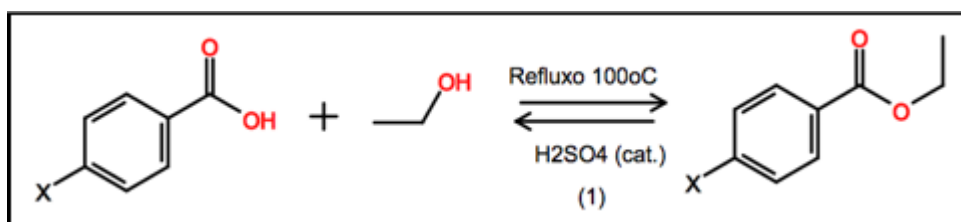


Figura 10: Esquema reacional para a obtenção de ésteres etílicos.

Partindo-se de 10 mmol do ácido carboxílico correspondente, em 15 mL de etanol anidro, adicionou-se 1,7 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por quatro horas, sob agitação, e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) a cada uma hora, empregando-se placa de sílica em folha de alumínio como fase estacionária e como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila na proporção de 2:1. Após este período, a reação foi neutralizada em solução de bicarbonato de sódio e o pH foi ajustado para 8 a 9. O éster foi extraído com três porções ~10 mL de acetato de etila e lavado com água

destilada, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e o solvente evaporado em rotaevaporador.

#### 4.2.1.2. Preparação das hidrazidas

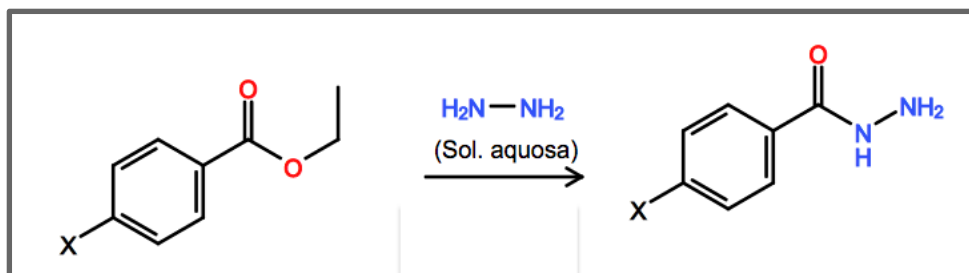


Figura 11: Esquema reacional para a obtenção das hidrazidas.

Partindo-se de 5 mmol do éster previamente sintetizado e 50 mmol de hidrato de hidrazina a 85% (p/v) em água, agitou-se a mistura reacional sob refluxo por duas horas, acompanhando-se a reação por CCD eluída com uma mistura de hexano:acetato de etila em proporção de 2:1. Finalizada a reação, a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo, o sólido formado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada. As hidrazidas obtidas foram mantidas em dessecador, sob pressão reduzida, em presença de pentóxido de fósforo.

#### 4.2.1.3. Preparação do cromeno (3-formilcromona)

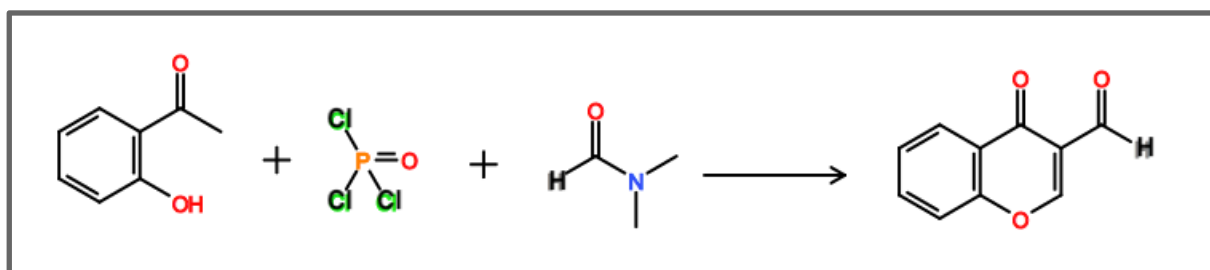


Figura 12: Esquema reacional para a obtenção do cromeno.

Oxicloreto de fósforo (3 mmol) foi dissolvido em 3 mmol de  $N,N$ -dimetilformamida anidra e a mistura reacional foi mantida sob banho de gelo por 30 minutos e sob atmosfera inerte de nitrogênio gasoso. Após este período, 1 mmol de orto-hidroxi-acetofenona foi adicionado à mistura reacional que foi, então, mantida sob agitação à 40 °C por quatro horas. Após este período, adicionou-se água à

reação obtendo-se um sólido o qual foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. A 3-formilcromona obtida foi mantida em dessecador, sob pressão reduzida, em presença de pentóxido de fósforo.

#### 4.2.1.4. Preparação das *N*-acilidrazonas cromênicas

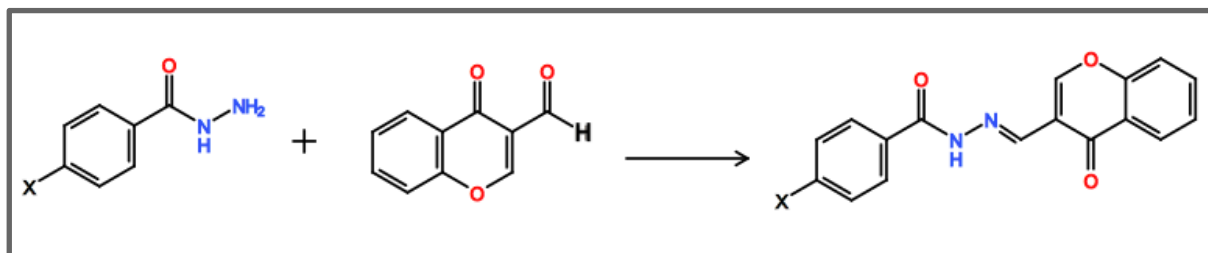


Figura 13: Esquema reacional para a obtenção do composto final.

Em balão de fundo redondo adicionou-se 3 mmol da hidrazida e de 3 mmol da 3-formilcromona, em 10 mL de etanol:água em proporção de 8:2 e a mistura reacional foi mantida sob refluxo por uma hora e meia, sendo a reação acompanhada por CCD eluída com hexano:acetato de etila (2:1). Após este período, a mistura foi resfriada em banho de gelo, o sólido formado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada. O produto foi mantido em dessecador, sob pressão reduzida, em presença de pentóxido de fósforo.

#### 4.2.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de citotoxicidade contra células leucêmicas HEL foram realizados pela Profa. Dra. Mariana Lazarini e seus colaboradores. Já os ensaios de citotoxicidade frente a macrófagos J774 foram realizados pelo Prof. Dr. Luiz Felipe Passero.

##### 4.2.2.1. Estudos de viabilidade celular

A proliferação e toxicidade celular foi avaliada pelo ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Resumidamente, um total de  $2 \times 10^4$  células leucêmicas (HEL 92.1.7[ATCC®TIB-180]) por poço, foi cultivado em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% SFB sob diferentes

concentrações (1,56 µg/mL, 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 25 µg/mL) de glicose ou de glutamina por 48 e 72 horas, além do veículo (controle - DMSO). Após este período, 10 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL foi adicionada em cada poço e as células foram incubadas na estufa à 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 0,1 M HCl em isopropanol. A viabilidade celular foi então mensurada por um espectrofotômetro a 490 nm de absorbância.

#### 4.2.2.2. Estudos de citotoxicidade

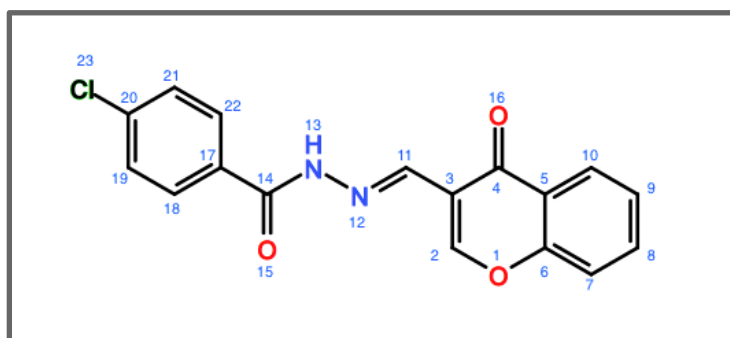
Cerca de  $10^6$  macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 juntamente com os compostos nas concentrações de 0,56 a 100,00 µg/mL. As células foram incubadas em incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1000 RPM por 10 minutos a 4°C e lavadas por 2 vezes com solução fisiológica. A viabilidade celular foi avaliada através da oxidação da resazurina (Life Technologies, EUA). Após duas horas, as placas foram lidas utilizando leitor de ELISA com filtro de fluorescência (emissão 515 nm e excitação 630 nm).

## 5. RESULTADOS

A proposta do presente trabalho envolveu a síntese de sete compostos derivados cromênicos, sendo que destes, cinco foram sintetizados em bons rendimentos (GPQF-302, -303, -305, -307, -308), um não pôde ser purificado (GPQF-309) e um apresentou lipofilicidade elevada. Este último apresentou-se insolúvel na maioria dos solventes orgânicos disponíveis para que pudesse ser caracterizado (GPQF-304), incluindo o DMSO deuterado, no qual realizou-se a caracterização por RMN.

Todos os compostos obtidos foram caracterizados por Espectrometria no infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) e espectrometria de massas. Os intermediários reacionais foram obtidos e caracterizados de acordo com a literatura (ANDRE, 2015).

### 5.1. GPQF 302: 4-chloro-N'-[(4-oxo-4H-1-benzopyran-3-yl)methylidene] benzohydrazide; pó amarelo claro

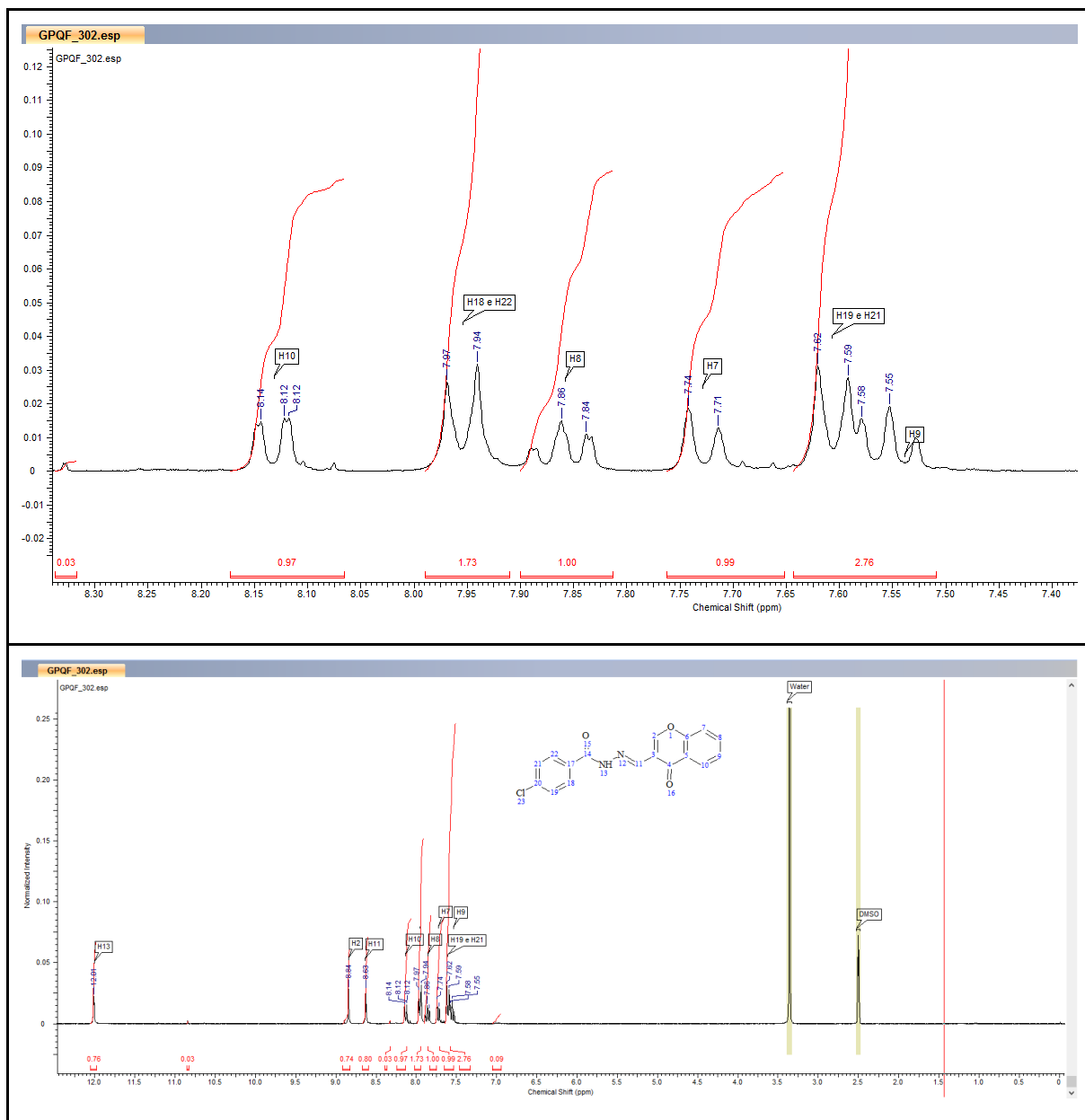


Substituinte	Rendimento	Fator de retenção em CCD	Peso molecular (g/mol)
4-cloro	61,17%	0,11	326,778

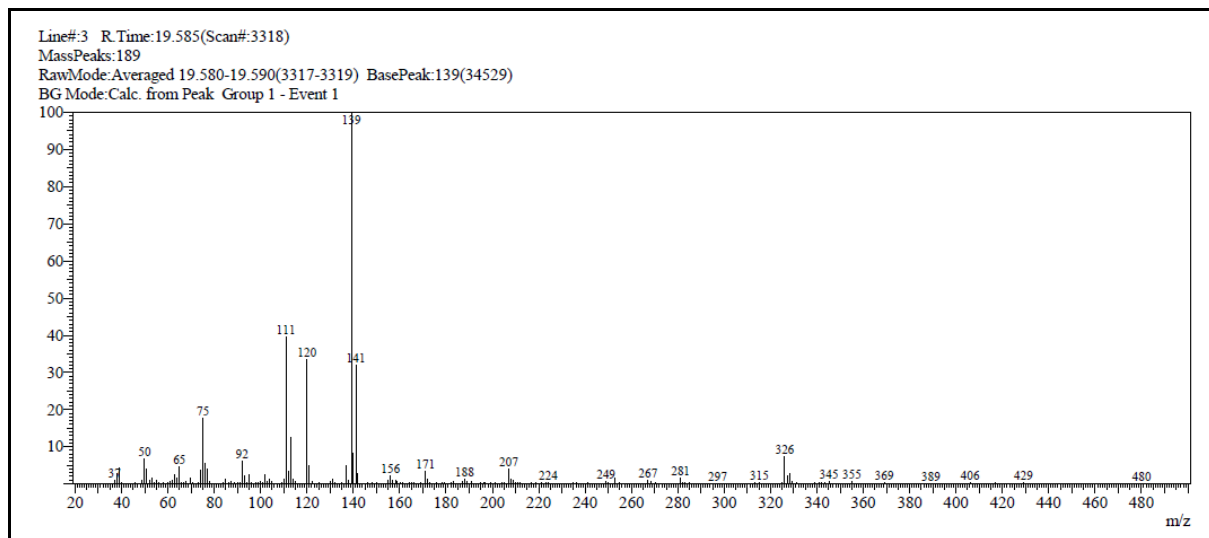


$^1\text{H}$ -RMN	IV ( $\text{cm}^{-1}$ )
$^1\text{H}$ -RMN , 300MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , $\delta$ (ppm) = 7,55 (t, 9Hz, 1H, H9); 7,61 (d, 3Hz, 2H, H19 e H21); 7,72 (d, 6Hz, 1H, H7); 7,86 (t, 1H, H8); 7,95 (d, 6Hz, 2H, H18 e H22); 8,13 (d, 3Hz, 1H, H10); 8,63 (s, 1H, H11); 8,84 (s, 1H, H2); 12,01 (s, 1H, H13).	3278 ( $\nu\text{N-H}$ ), 1664 ( $\nu\text{C=O}$ , cromeno), 1639 ( $\nu\text{C=O}$ , N-acilidrazona), 1591 ( $\nu\text{C=N}$ ), 1554 ( $\nu\text{C=C}$ ), 1087 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $\text{d}_6$ , 300 MHz)

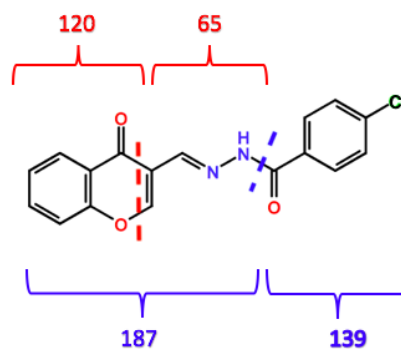


## Espectrometria de massas (EI, 70 eV)

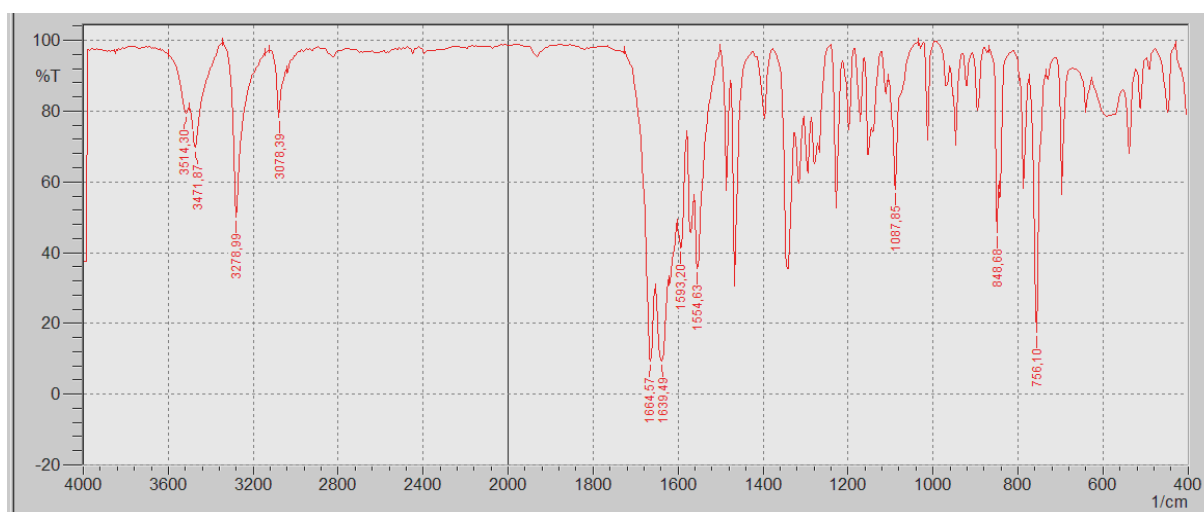


m/z= 326

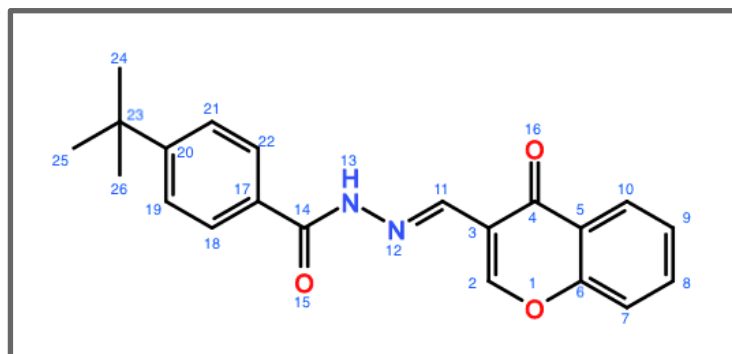
Principais fragmentações:



## Infravermelho (KBr, 4000-400 cm<sup>-1</sup>)



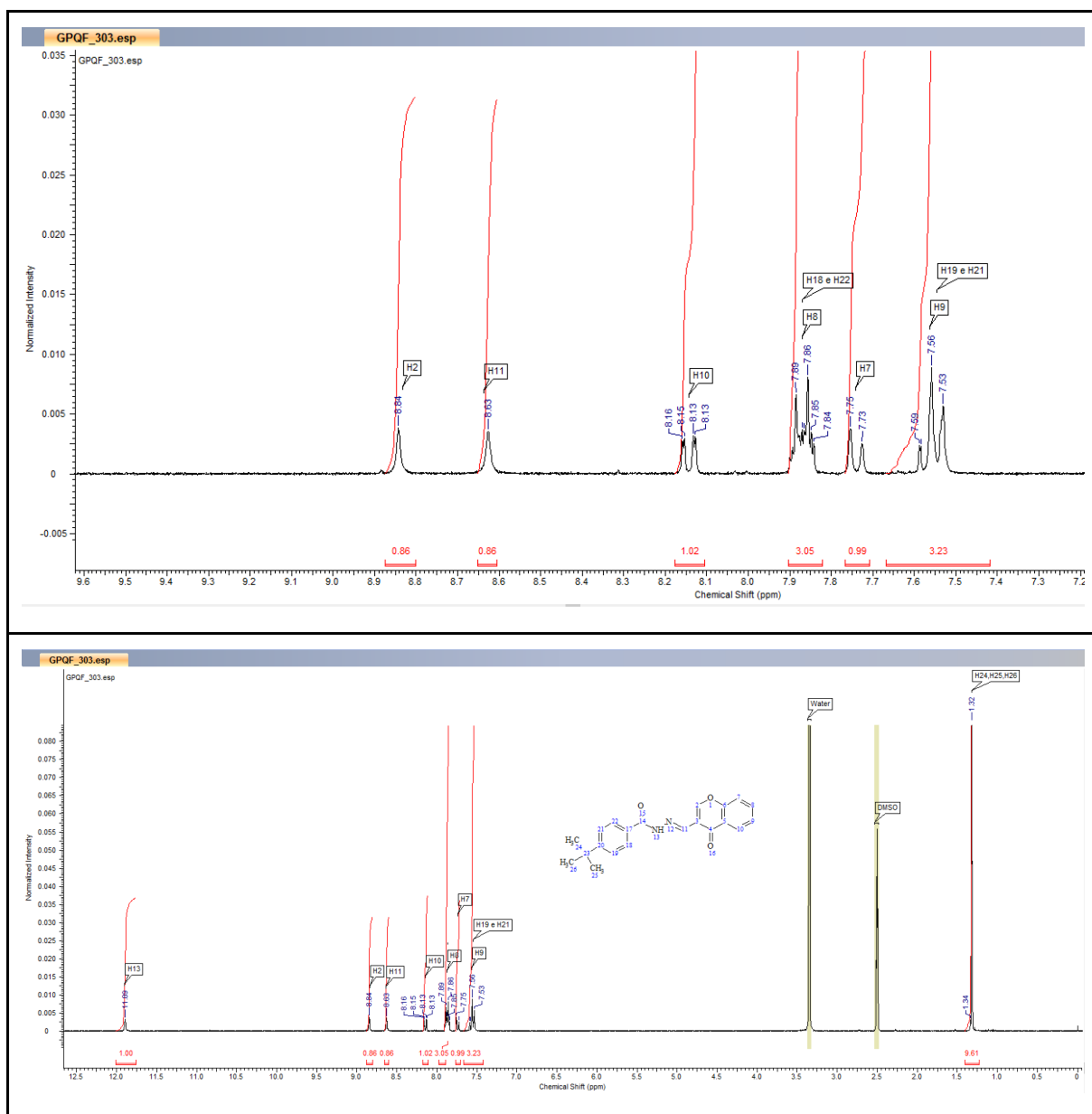
**5.2 GPQF 303:** 4-*tert*-butyl-*N'*-[(4-oxo-4*H*-1-benzopyran-3-yl)methylidene] benzohydrazide; pó bege claro



Substituinte	Rendimento	Fator de retenção em CCD	Peso molecular (g/mol)
4- <i>tert</i> -butil	93,2%	0,28	348,39

<sup>1</sup> H-RMN	IV (cm <sup>-1</sup> )
<sup>1</sup> H-RMN , 300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , δ (ppm) = 1,32 (s, 9H, H24, H25 e H26); 7,53-7,59 (m, 3H, H9, H19 e H21); 7,74 (d, 3Hz, 1H, H7); 7,84-7,89 (m, 3H, H8, H18 e H22); 8,14 (d, 3Hz, 1H, H10); 8,63 (s, 1H, H11); 8,84 (s, 1H, H2); 11,09 (s, 1H, H13).	3271 (νN-H), 2958 e 2868 (νC-H, <i>tert</i> -Bu), 1674 (νC=O, cromeno), 1622 (νC=O, N-acilidrazona), 1587 (νC=N), 1527 (νC=C)

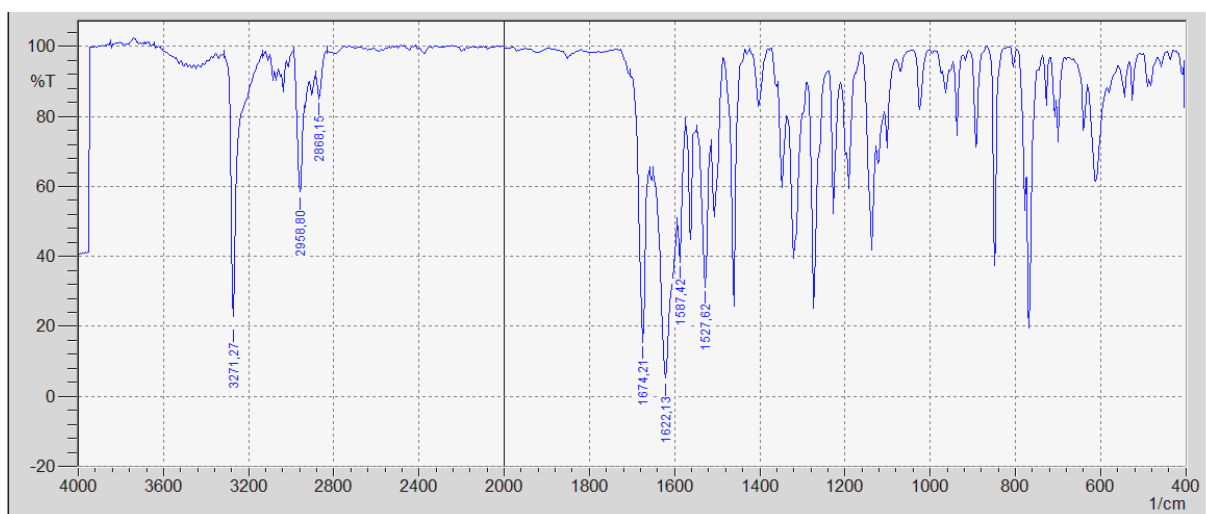
# <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz)



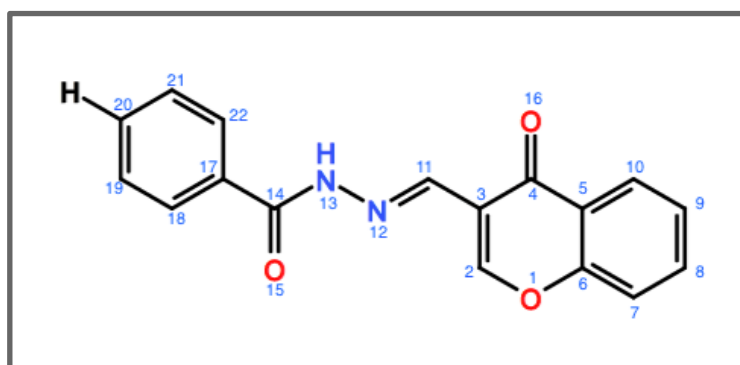
## Espectrometria de massas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Não foi possível realizar a análise em questão.

Infravermelho (KBr, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



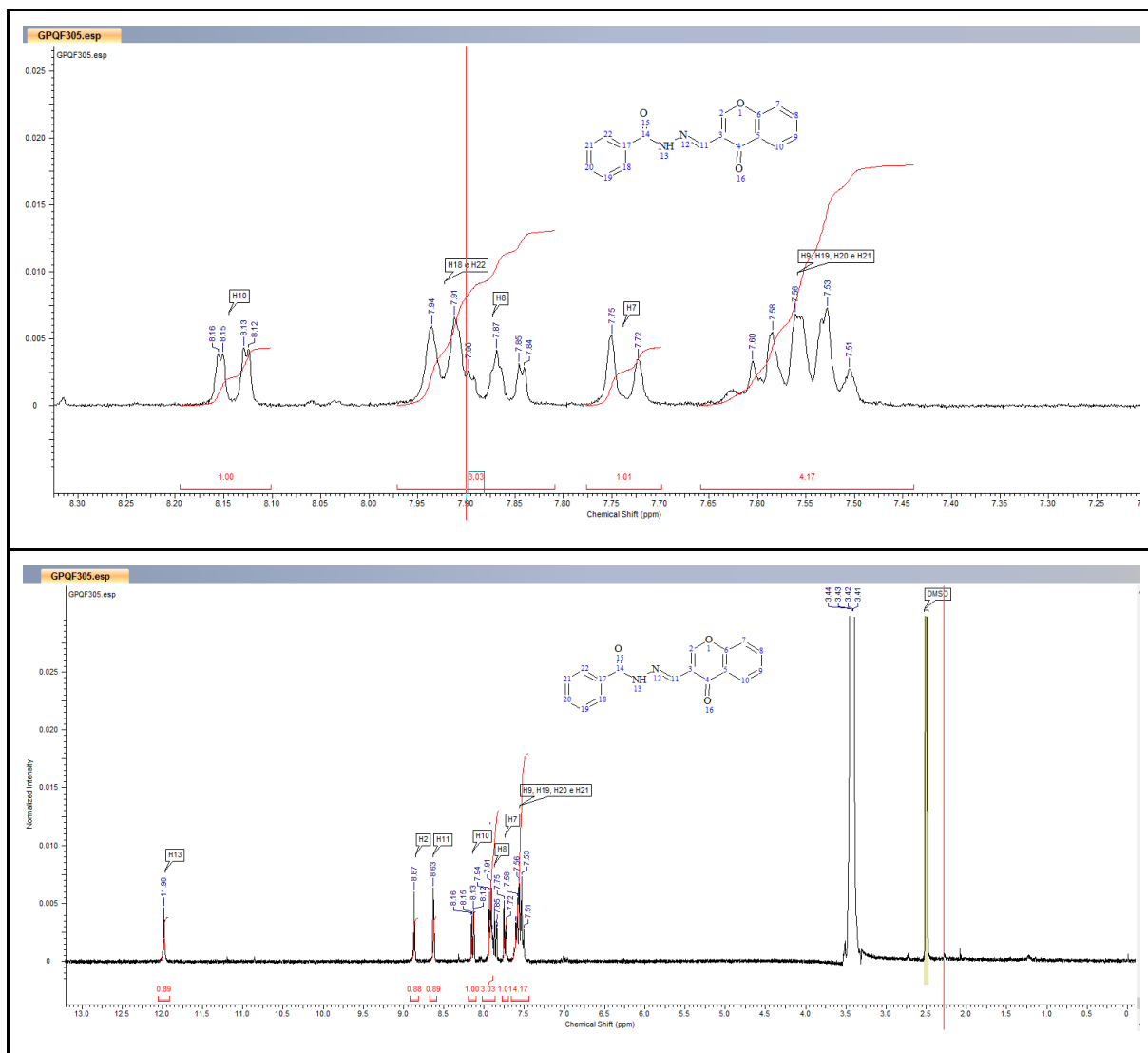
**5.3 GPQF 305:** *N*-[(4-oxo-4*H*-1-benzopyran-3-yl)methylidene]benzohydrazide, sólido amarelo claro



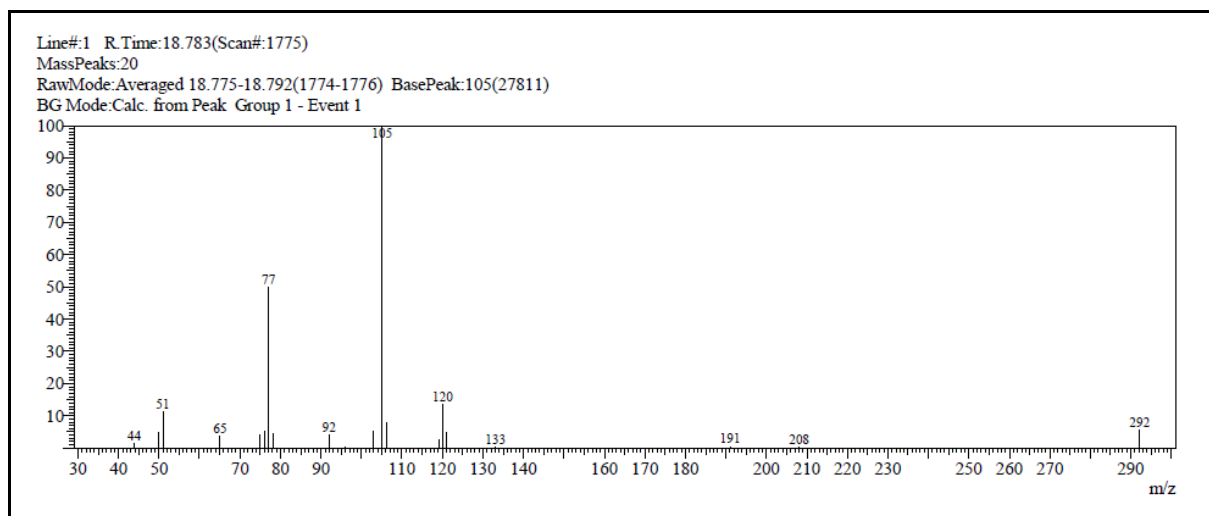
Substituinte	Rendimento	Fator de retenção em CCD	Peso molecular (g/mol)
Não substituído	74%	0,18	292,29

$^1\text{H}$ -RMN	IV ( $\text{cm}^{-1}$ )
$^1\text{H}$ -RMN , 300MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ (ppm) = 7,51 -7,80 (m, 4H, H9, H19, H20 e H21); 7,74 (d, 3Hz, 1H, H7); 7,87 (t, 9Hz, 1H, H8); 7,92 (d, 6Hz, 2H, H18 e H22); 8,14 (d, 9Hz, 1H, H10); 8,63 (s, 1H, H11); 8,87 (s, 1H, H2); 11,98 (s, 1H, H13).	3280 ( $\nu\text{N-H}$ ), 1678( $\nu\text{C=O}$ , cromeno), 1637 ( $\nu\text{C=O}$ , N-acilidrazona), 1616 ( $\nu\text{C=N}$ ), 1529 e 1462 ( $\nu\text{C=C}$ ).

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)

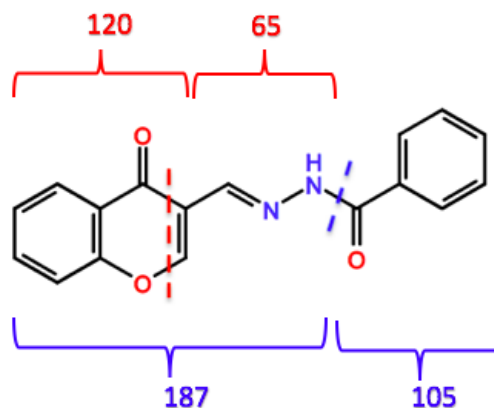


## Espectrometria de massas

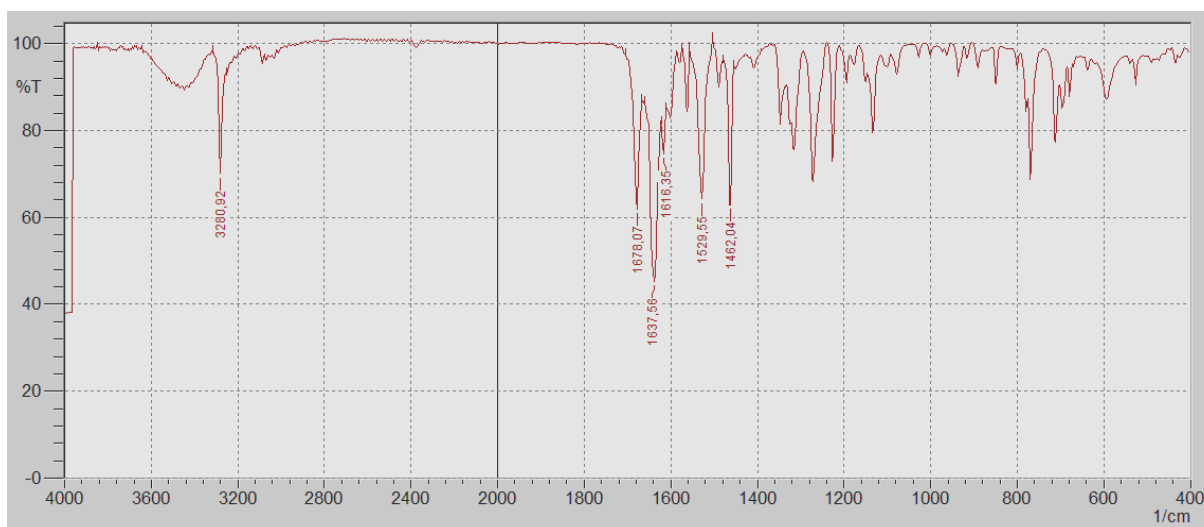


m/z = 292

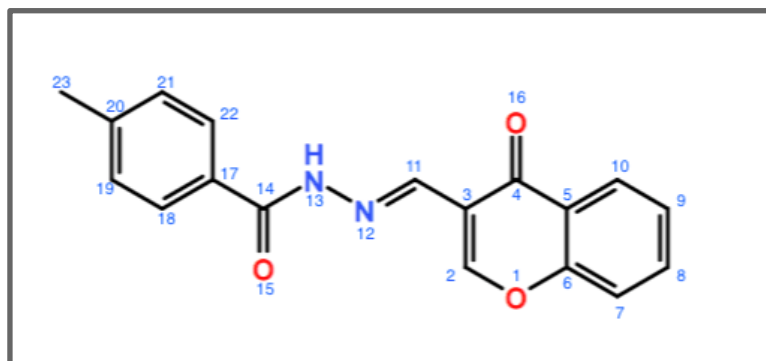
Principais fragmentações:



Infravermelho (KBr, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



5.4. **GPQF 307:** 4-methyl-N'-[(4-oxo-4H-1-benzopyran-3-yl)methylidene] benzohydrazide, pó amarelo claro

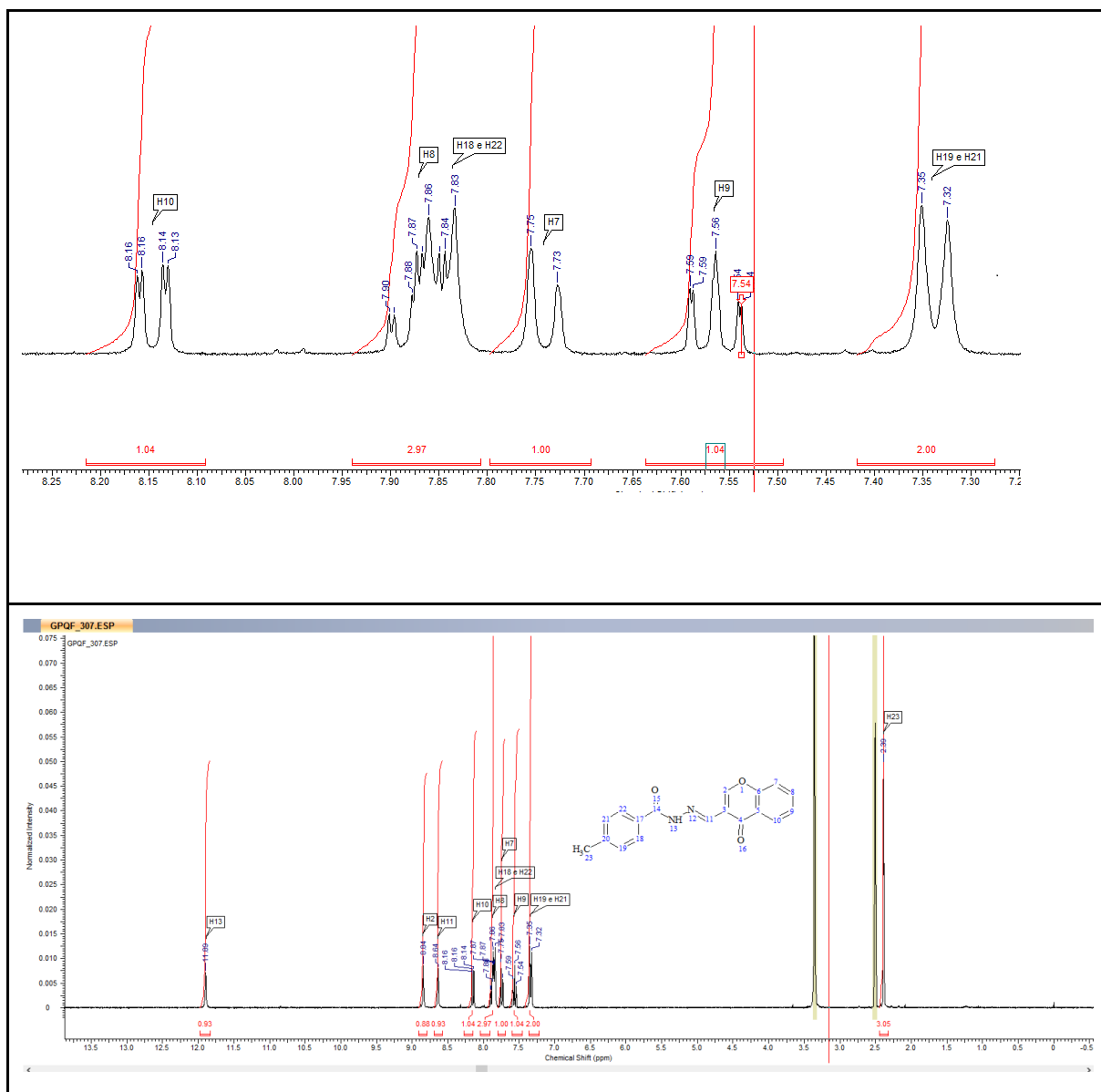


Substituinte	Rendimento	Fator de retenção em CCD	Peso molecular (g/mol)
4-metila	não determinado	0,16	306,31

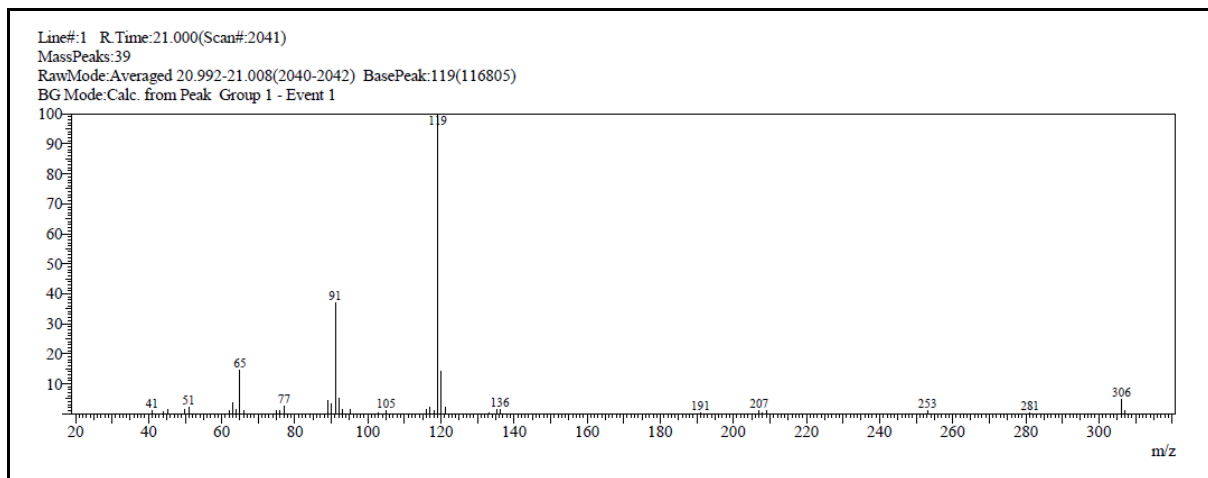
<sup>1</sup> H-RMN	IV (cm <sup>-1</sup> )
<sup>1</sup> H-RMN , 300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , δ (ppm) = 2,39 (s, 3H, H23); 7,33 (d, 9Hz, 2H, H19 e H21); 7,56 (t, 9Hz, 1H, H9); 7,74 (d, 6Hz, 1H, H7); 7,83-7,90 (m, 3H, H8, H18 e H22); 8,15 (d, 9Hz, 1H, H10); 8,64 (s, 1H, H11); 8,84 (s, 1H, H2); 11,89 (s, 1H, H13).	3190 (νN-H), 3034 (νC-H, metila), 1649 (νC=O, cromeno), 1629 (νC=O, N-acilidrazona), 1566 (νC=N), 1508 e 1465 (νC=C)



<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz)

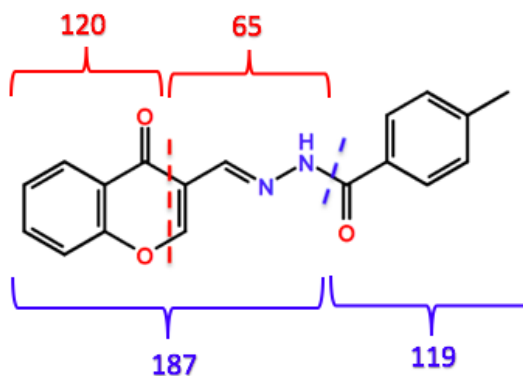


## Espectrometria de massas

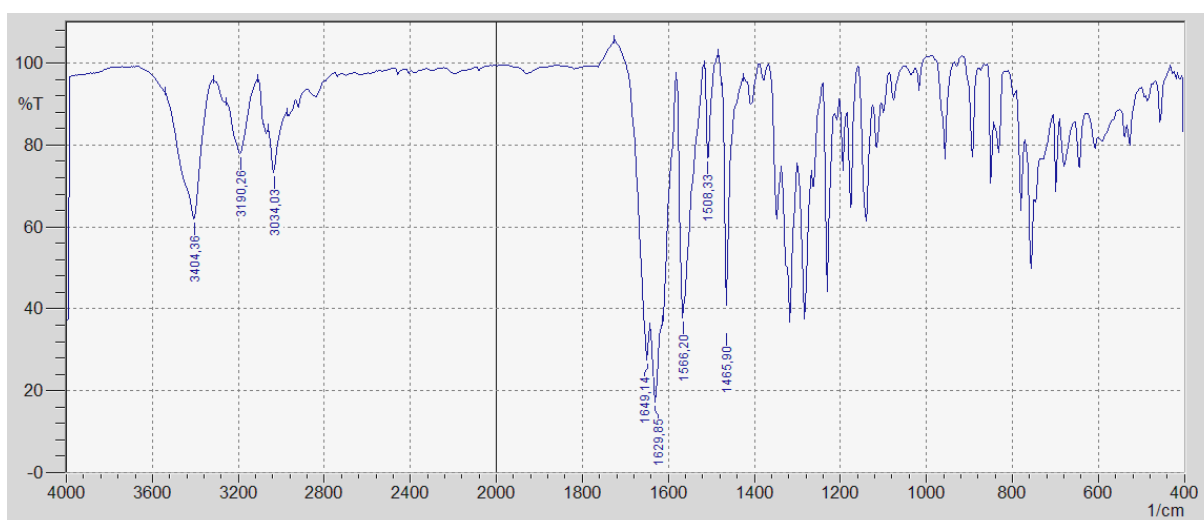


m/z= 306

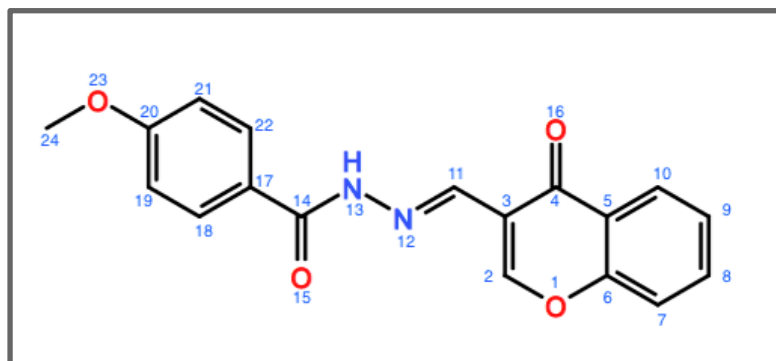
Principais fragmentações:



Infravermelho (KBr, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



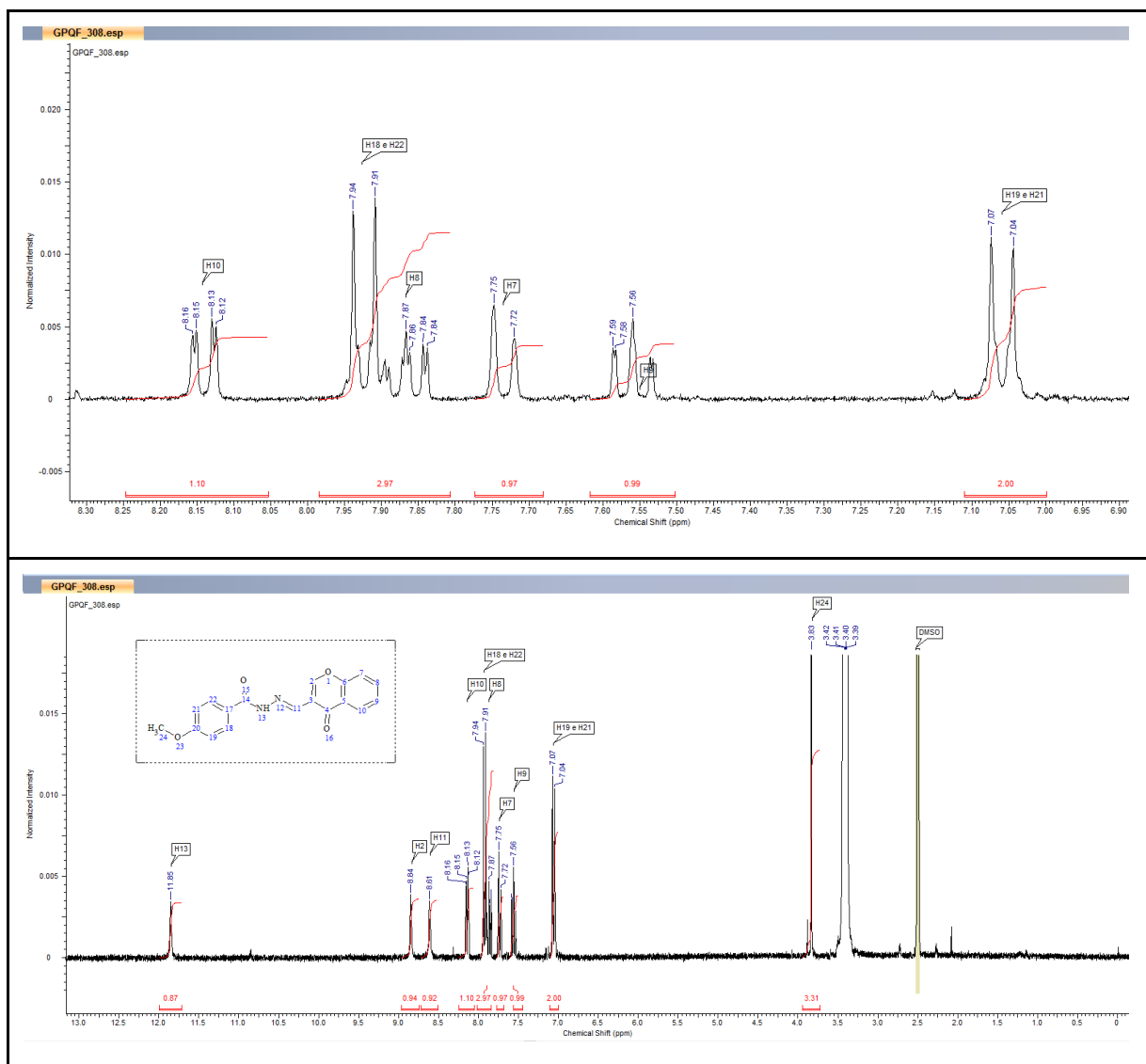
5.5. **GPQF 308:** 4-methoxy-N'-[(4-oxo-4H-1-benzopyran-3-yl)methylidene] benzohydrazide; sólido branco



Substituinte	Rendimento	Fator de retenção em CCD	Peso molecular (g/mol)
4-metoxila	87,8%	0,55	322,31

<sup>1</sup> H-RMN	IV (cm <sup>-1</sup> )
<sup>1</sup> H-RMN, 300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , δ (ppm) = 3,83 (s, 3H, H24); 7,05 (d, 6Hz, 2H, H19 e H21); 7,56 (t, 9Hz, 1H, H9); 7,73 (d, 6Hz, 1H, H7); 7,84 a 7,94 (m, 3H, H8, H18 e H22); 8,14 (d, 9Hz, 1H, H10); 8,61 (s, 1H, H11); 8,84 (s, 1H, H2); 11,85 (s, 1H, H13).	3263 (νN-H), 3034 (νC-O, C-H, CH <sub>3</sub> ), 1676 (νC=O, cromeno), 1629 (νC=O, N-acilidrazona), 1604 (νC=N), 1535 (νC=C)

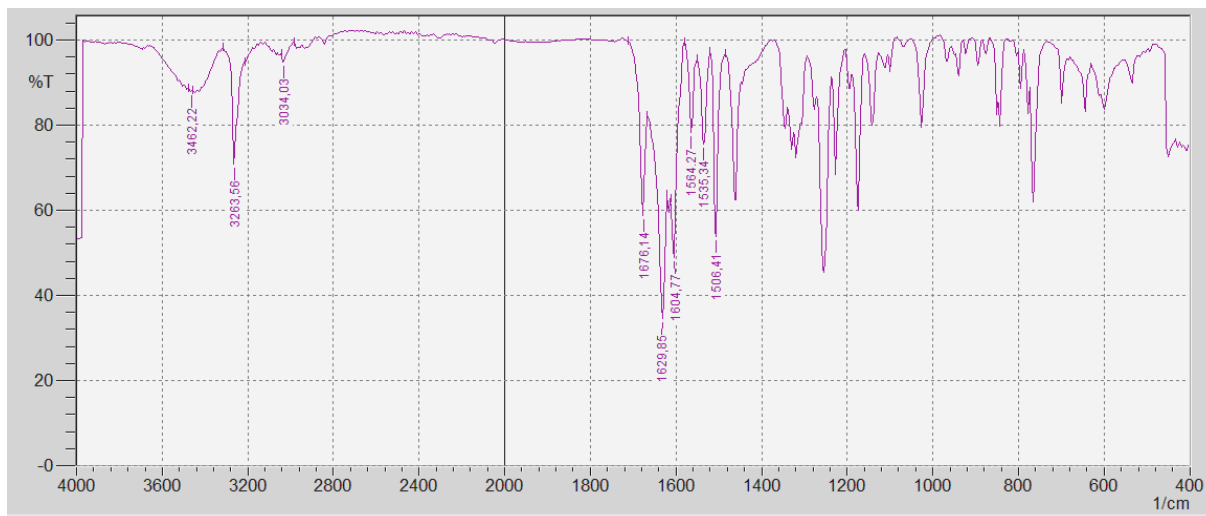
## <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz)



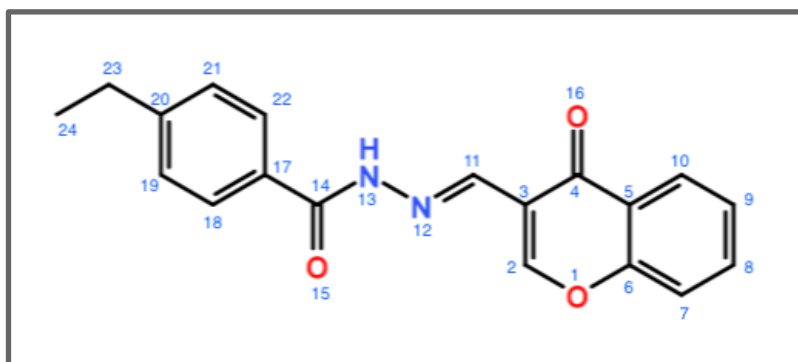
## Espectrometria de massas<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Não foi possível realizar a análise em questão.

Infravermelho (KBr, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



5.6. **GPQF 309:** 4-ethyl-N'-[(4-oxo-4H-1-benzopyran-3-yl)methylidene] benzohydrazide; pó amarelo escuro (impuro, provavelmente coloração devido à presença do aldeído cromênico)



Substituinte	Rendimento	Fator de retenção em CCD	Peso molecular (g/mol)
4-etila	60%	0,28	320,34

1H NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d6. The spectrum shows peaks at 13.37 (NH of hydrazide), 12.29 (NH of hydrazide), 11.24 (NH of hydrazide), 10.39 (H of aldehyde), 9.09 (H of aldehyde), 7.88, 7.65, 7.40, 7.37, 7.34, 7.31, 7.27, 7.21, 7.18, 7.05, 6.88, 6.85, 2.73, 2.69, 2.67, 2.64, 1.24, 1.22, 1.19, and 0.00 (TMS). Integration values are shown below the peaks: 0.08, 0.60, 1.88, 2.25, 0.74, 1.91, and 3.00. The chemical structure of the compound is shown above the spectrum.

As células leucêmicas utilizadas para os ensaios de viabilidade celular em MTT foram do tipo HEL 92.1.7[ATCC®TIB-180). Essas células foram escolhidas para o estudo por possuírem uma mutação específica para a via JAK-STAT. Os resultados apresentados pelo ensaio MTT demonstraram que os compostos avaliados (GPQF-302, -303 e -307) não apresentaram inibição da viabilidade celular, independente da concentração utilizada (entre 1,56 e 25 µg/mL) ou do tempo de incubação.

Em termos práticos, a viabilidade celular dos compostos foi observada através da tonalidade dos poços contidos nas placas testadas. Poços com cor roxo escuro (figuras 14 e 15) demonstram pouca inibição da viabilidade celular, enquanto que poços em roxo mais claro, evidenciam a inibição da viabilidade celular. Quanto mais claro o poço, maior a inibição de crescimento celular exercida pelos compostos em teste. Nos estudos conduzidos pela professora Mariana Lazarini e colaboradores, os compostos avaliados permaneceram com coloração roxo escuro.

evidenciando que não houve inibição da viabilidade celular, e as células leucêmicas permaneceram intactas.

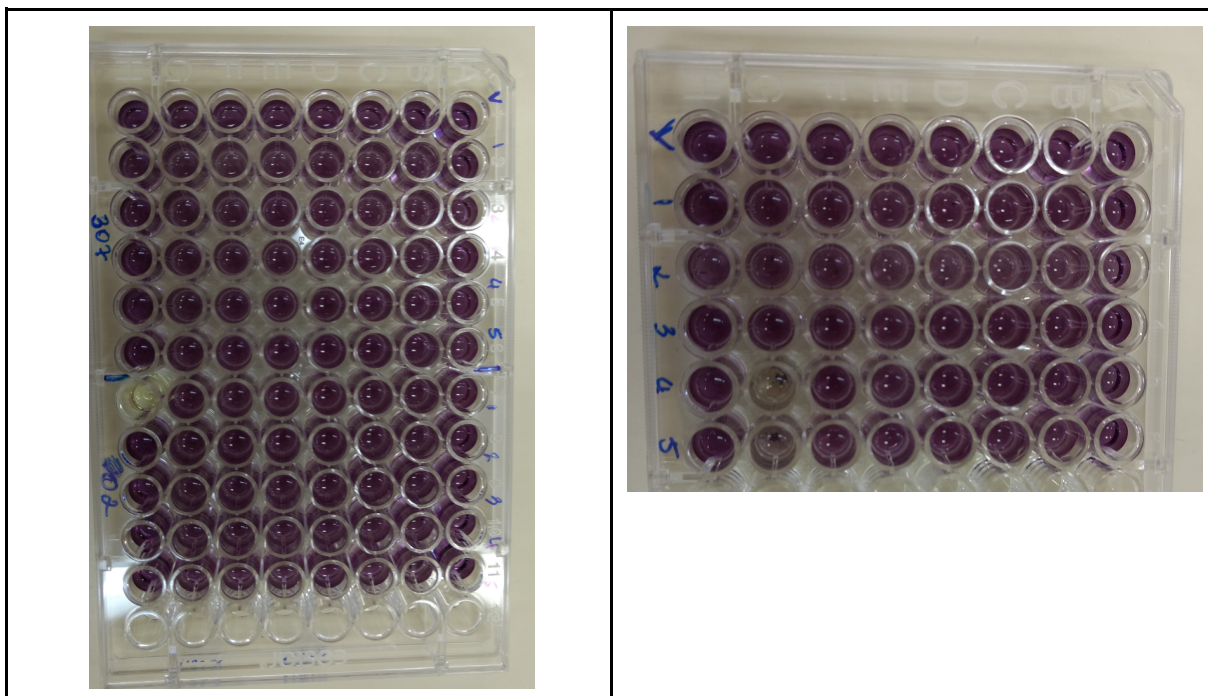


Figura 14: Resultados do ensaio MTT após 48 horas de incubação. V: veículo, 1 a 5, as concentrações variando de 1,56 e 25  $\mu\text{g/mL}$

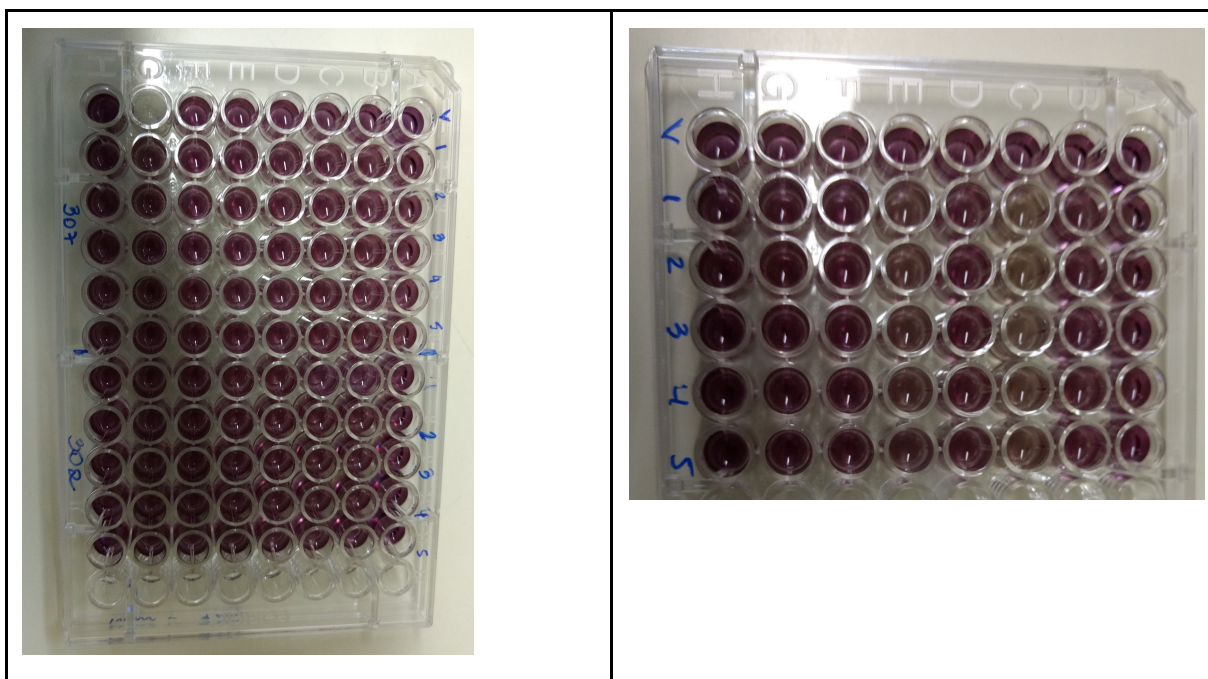


Figura 15: Resultados do ensaio MTT após 72 horas de incubação

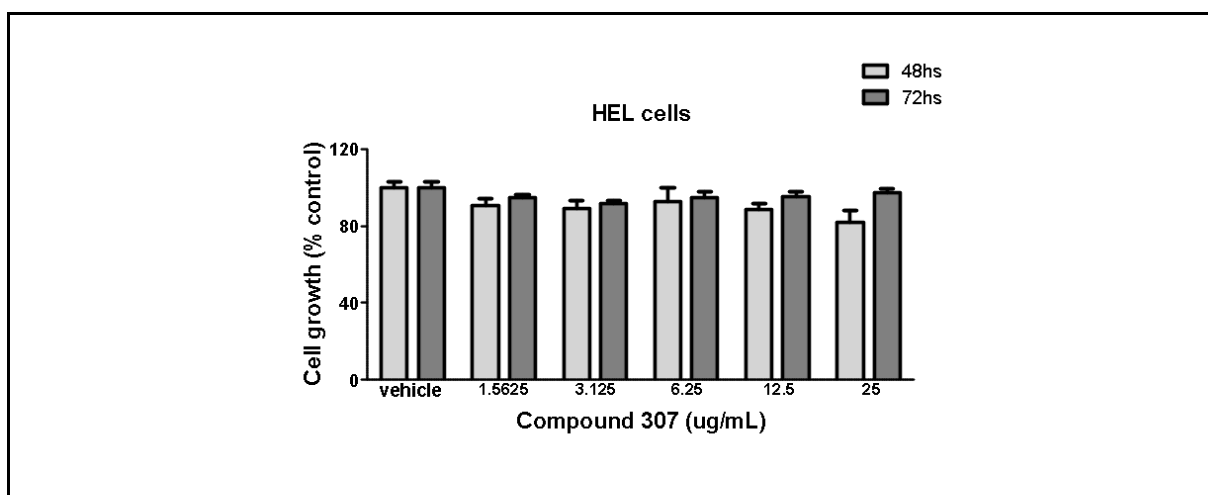
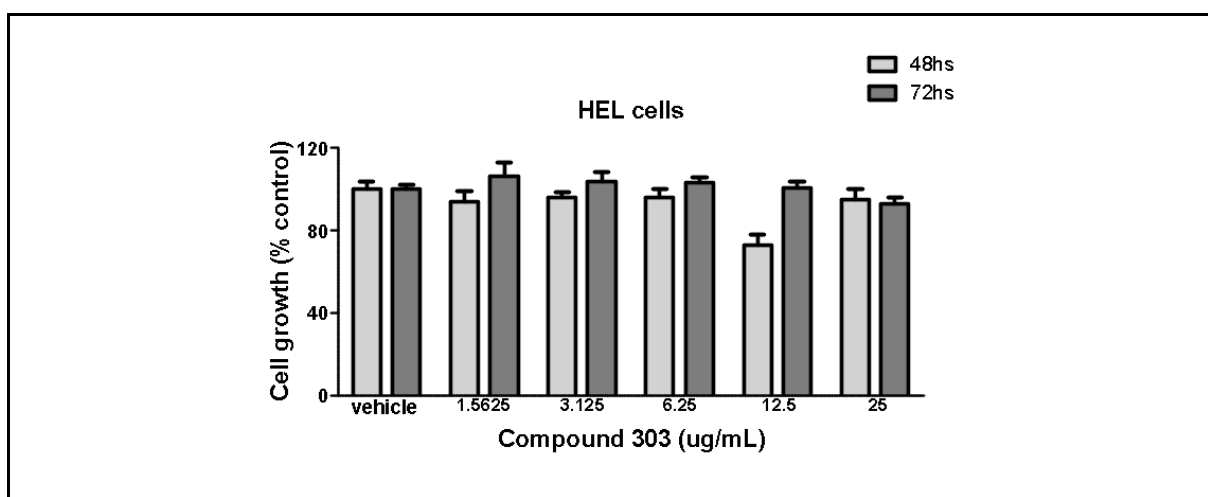
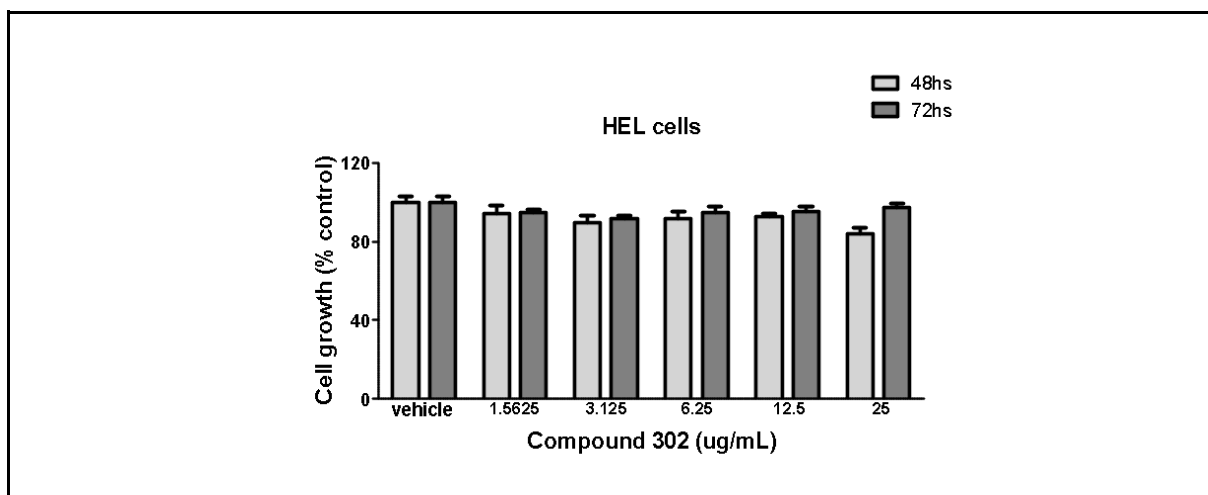


Figura 16: gráficos de viabilidade celular dos compostos GPQF 302, 303 e 307, com os respectivos desvios padrão em cada concentração testada.

Os compostos foram testados, ainda, contra macrófagos da linhagem tumoral J774. Estes resultados, obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Felipe



Domingues Passero do Campus Experimental do Litoral Paulista da UNESP são mostrados na Figura 17.

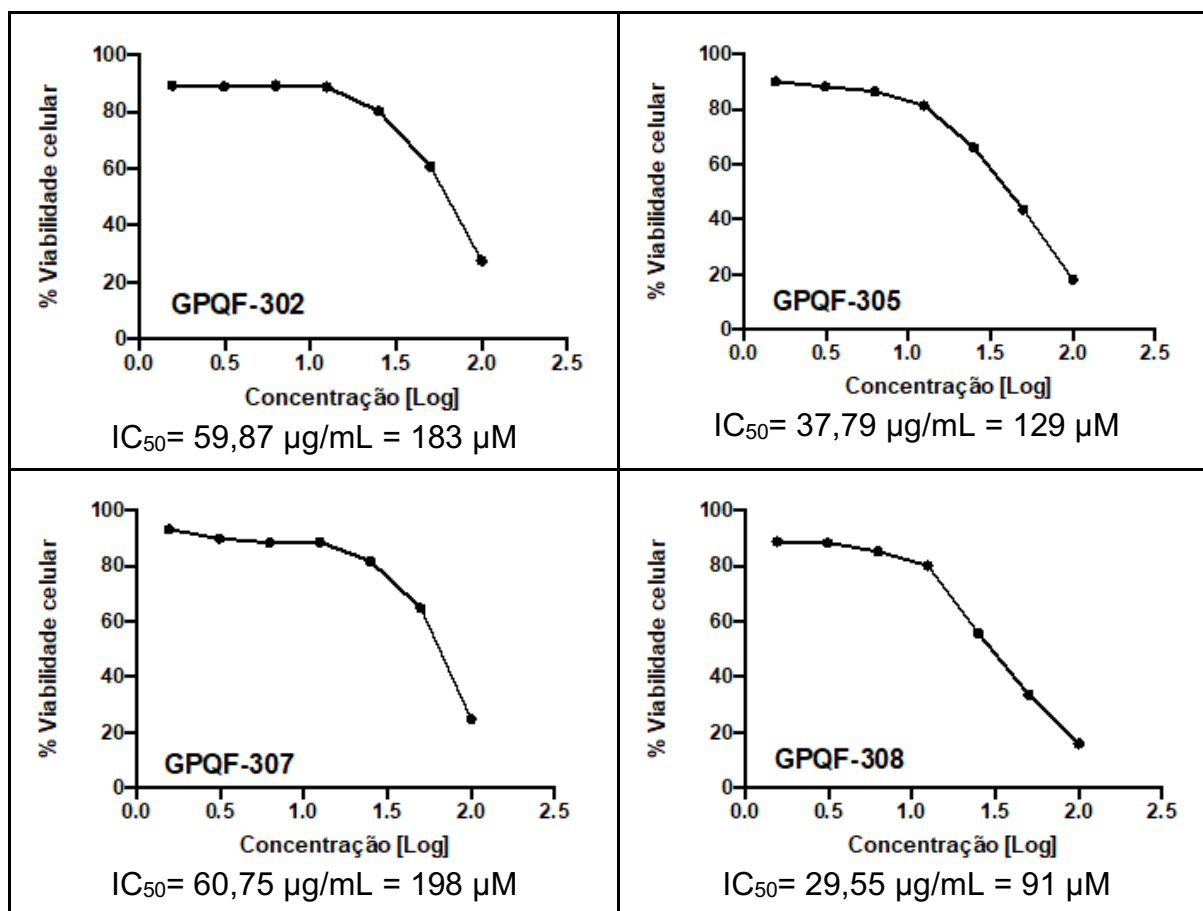


Figura 17: Gráfico de viabilidade celular vs. concentração testada dos compostos.

Os compostos 303 e 309 não foram testados pois, no caso do primeiro, não dispúnhamos de quantidade suficiente para a realização deste ensaio, e o segundo corresponde ao composto impuro e que, portanto, não foi enviado para os estudos biológicos.

Os resultados nestes estudos demonstram que a atividade citotóxica destes compostos é modesta frente aos macrófagos J774. O derivado de melhor performance foi o GPQF-308, análogo 4-metoxilado da série, que apresentou uma IC<sub>50</sub> de 91μM. Todos os demais compostos apresentaram IC<sub>50</sub> acima de 100 μM.

## 6. DISCUSSÃO

A série proposta neste trabalho foi delineada com o intuito de verificar se a produção de ligantes híbridos moleculares da nifuroxazida e do cromeno levaria a uma atividade antitumoral significativa e/ou otimizada quando comparada à própria nifuroxazida.

Com relação aos aspectos sintéticos deste trabalho, dos sete análogos propostos, cinco foram obtidos em pureza e rendimentos adequados.

Alguns cuidados, contudo, tiveram que ser observados para a síntese destes análogos. Inicialmente, tem-se que a obtenção do éster ocorre por meio de uma esterificação de Fischer, onde o éster é resultado da reação entre um ácido carboxílico e um álcool, sob catálise ácida. No caso dos ésteres em questão, têm-se que a reação é mantida em sistema de refluxo por cerca de cinco horas e, então, segue para a etapa de extração. Acredita-se que a etapa de extração é muito importante, pois é preciso garantir a extração do éster sem arraste do ácido carboxílico de partida.

Na segunda etapa sintética, que é a obtenção das hidrazidas, a reação do éster e da hidrazina, geralmente, é uma reação altamente favorável por conta da alta nucleofilicidade da hidrazina. Neste contexto, a reação da maioria das moléculas ocorre entre uma e duas horas de reação, porém, dependendo do substituinte na posição para da porção carboxílica da molécula, o tempo de reação pode variar. Este foi o caso dos ésteres 4-etil e 4-terc-butil. Essas duas substituições no éster dificultam a reação da hidrazina na porção carboxílica da molécula por serem indutores, ou seja, doam elétrons para a carbonila, tornando-a menos eletrofílica ao ataque nucleofílico da hidrazina, fazendo com que a reação dure, em média, 12 horas. De maneira geral, as hidrazidas apresentam bons rendimentos.

A etapa final é o acoplamento do aldeído cromênico com as hidrazidas. Esta etapa ocorre geralmente em duas horas e o produto final, sólido, pode ser facilmente purificado por filtração simples e lavagem com água para remoção de impurezas. Os compostos produzidos apresentam uma significativa insolubilidade em água, o que permite a remoção das hidrazidas de partida, as quais são relativamente mais solúveis neste meio do que os produtos finais. O aldeído cromênico, quando totalmente consumido na reação, não constituiu um problema para a purificação dos compostos finais.

Os compostos GPQF-302, -303, -305, -307 e -308 tiveram suas estruturas confirmadas pelas análises de espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênios e espectrometria de massas.

Tomando o composto GPQF-307 como exemplo para discutir as atribuições, podemos notar a presença da banda em  $3190\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação NH da função hidrazida da estrutura, bem como o característico estiramento em  $1566\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo azometino ( $\text{C}=\text{N}$ ). O estiramento C-H da metila do grupo substituinte aparece em  $3034\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que o estiramento C=O da *N*-acilidrazona aparece como uma banda forte em  $1629\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro de  $^1\text{H}$ -RMN podemos observar o sinal referente à formação do grupo azometino, o CH em 8,64 ppm, o qual estaria presente apenas quando o produto final é formado (H11). Também é bastante característico o sinal em 11,89 ppm, relativo ao hidrogênio mais desprotegido da estrutura, do NH da função *N*-acilidrazona (H13). Além destes, os sinais em 2,39 ppm (H23), referente à metila substituinte, e os em 7,33 ppm (H19, H21), 7,56 ppm (H9), 7,74 ppm (H7), 7,83-7,90 ppm (H8, H18, H22), 8,15 ppm (H10), 8,84 ppm (H2) referentes aos hidrogênios do sistema aromático e do cromeno, também puderam ser caracterizados.

Por fim, a espectrometria de massas mostra o íon molecular em 306 e as massas correspondentes aos fragmentos resultantes da quebra mais comum esperadas para este composto, a saber, entre o nitrogênio e o carbono da carbonila da função hidrazida, resultando no íon base de 119, e um fragmento de massa de 187. Este fragmento não é observado no espectro de massas indicando que tal fragmento representa um radical, o qual não possui carga e, por esta razão, não aparece no espectro. Outros fragmentos na forma de íons estão representados no espectro, como é o caso dos fragmentos de massa de 120 e 65.

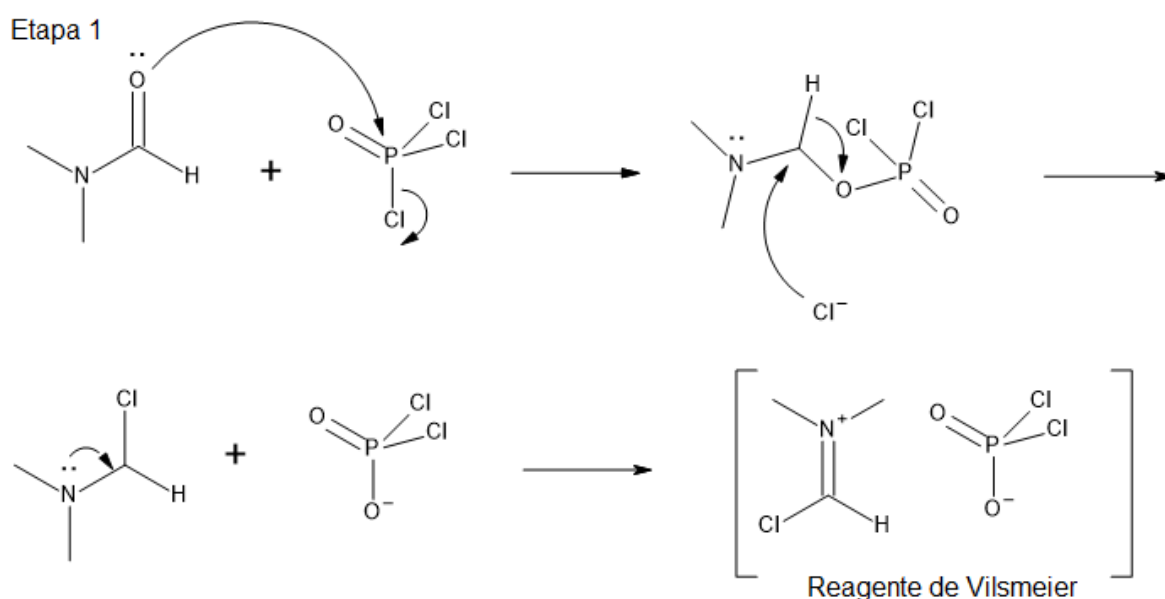
Este comportamento foi observado em todos os demais análogos da série, bem como o mesmo padrão de sinais de  $^1\text{H}$ -RMN e bandas de IV.

Dois compostos propostos inicialmente não puderam ser purificados, a saber, os derivados 304 e 309, sendo o 304 muito insolúvel em quaisquer dos solventes disponíveis no laboratório.

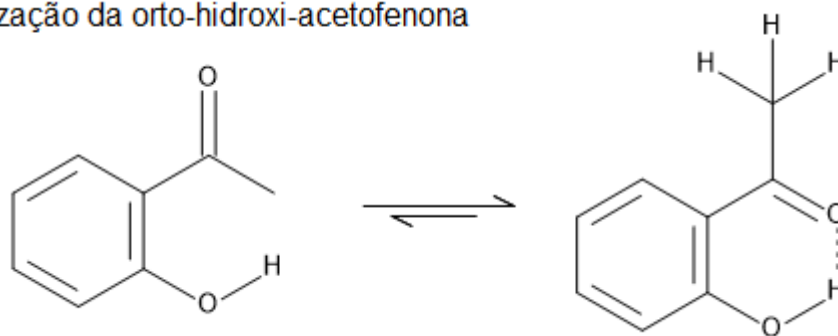
Já o composto 309, não pode ser purificado do aldeído cromênico de partida ou tampouco da hidrazida. Estas contaminações podem ser observadas no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN deste composto, pelos sinais em 10,37 ppm, correspondente ao

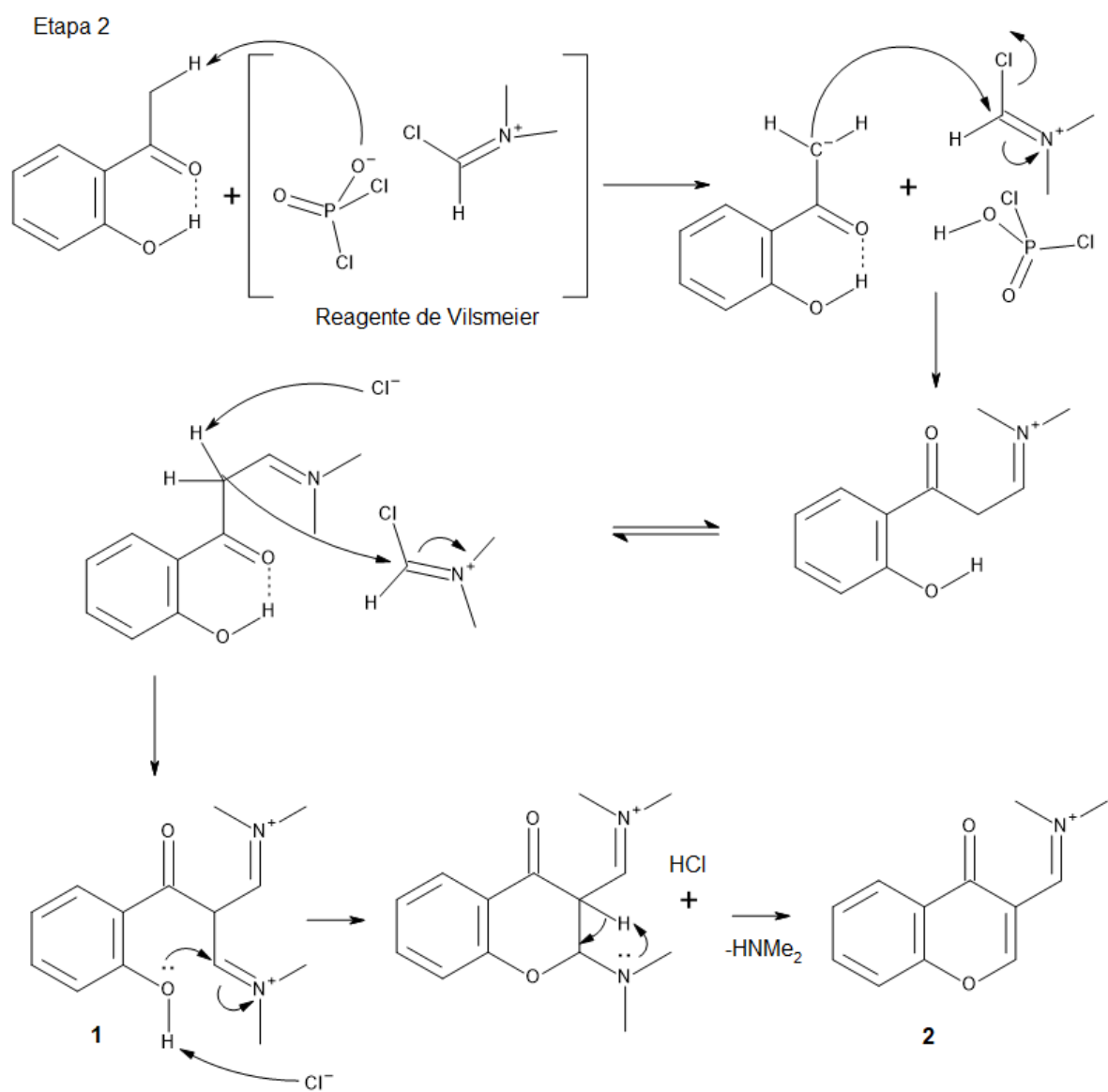
hidrogênio da função aldeído do cromeno, bem como pelo sinal em 12,29 ppm, identificado como pertencente à hidrazida de partida.

É importante destacar que o aldeído cromênico foi também sintetizado, sendo que esta etapa constituiu um desafio ao andamento deste trabalho. Este aldeído é obtido por meio de uma reação de Vilsmeier-Haack, a qual consiste na produção de um sal altamente reativo, o qual sofre facilmente ataque nucleofílico levando à formação de um segundo intermediário sintético que, em presença de água, produz a formilação do reagente nucleofílico.



#### Estabilização da orto-hidroxi-acetofenona





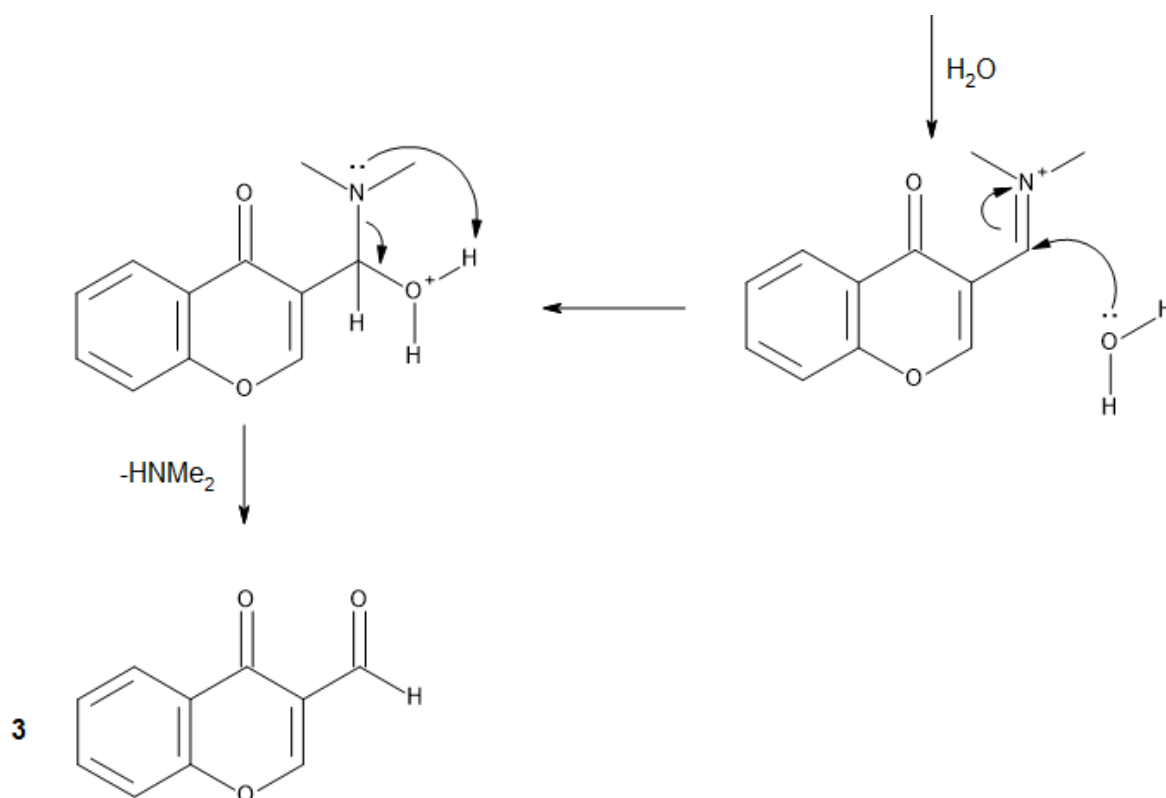


Figura 18: mecanismo de reação Vilsmeier-Haack

Esta reação exige uma série de cuidados para que se obtenha os produtos desejados. O primeiro destes é a necessidade de se manter um ambiente de atmosfera inerte, durante todo o curso da reação. Esta exigência se dá por conta da alta reatividade do oxiclreto de fósforo, utilizado na preparação do reagente de Vilsmeier, bem como do próprio reagente produzido, que facilmente reage com a água presente no ambiente. Pelas mesmas razões, ainda, a *N,N*-dimetilformamida empregada na reação deve ser previamente tratada para estar anidra durante a reação.

Por fim, um último cuidado com esta reação é a necessidade de controle de temperatura. Para tanto, utiliza-se banho de gelo a zero graus Celsius durante a adição do oxiclreto de fósforo à *N,N*-dimetilformamida.

Neste trabalho, todos os cuidados devidos foram tomados para a produção do reagente de Vilsmeier. O tratamento da DMF, contudo, não pôde ser realizado. A literatura indica que, para tornar a DMF anidra, deve-se refluxá-la em presença de pentóxido de fósforo ou agentes secantes mais amenos como sulfatos de magnésio e cálcio por algumas horas e, destilá-la, sob pressão reduzida, à 69 a 80°C. Por fim, para mantê-la anidra, a DMF deve ser armazenada na presença de peneira molecular de 4 Angstroms e sob atmosfera inerte. Infelizmente, devido às

dificuldades operacionais de se realizar tal destilação em nosso laboratório, não foi possível utilizar a DMF anidra, optando-se por manter o frasco sob peneira molecular e selado com parafilme. Este método, contudo, não é efetivo para manter este solvente/reagente anidro por longos períodos de tempo (ARMAREGO; PERRIN, 1996).

Como resultado, a produção do aldeído cromênico foi, por vezes, bastante prejudicada. A conversão incompleta dos reagentes em sal de Vilsmeier ou a reação deste com a água presente na DMF levou à produção de uma mistura reacional pastosa, ao invés do sal sólido esperado. Sabe-se que, nesta mistura, contudo, o reagente de Vilsmeier está presente, porém, as etapas posteriores de formilação são bastante prejudicadas, levando à produção de um aldeído que necessita de purificação por coluna cromatográfica (figura 19). A figura 20 demonstra o resultado da obtenção do cromeno, após sucessivas tentativas de extração do sólido. O cromeno ideal é um pó fino de cor rosa coral.



Figura 19: resultado da síntese do aldeído cromênico a partir de *N,N*-dimetilformamida não anidra.



Figura 20: obtenção do cromeno após várias etapas de extração.

As dificuldades enfrentadas na purificação do cromeno obtido a partir de DMF não tratada acabaram, por fim, por interferir com o rendimento dos compostos finais

obtidos. Para os primeiros compostos sintetizados, a saber, GPQF-302 e -303, os rendimentos e purezas obtidas foram melhores, visto que a DMF utilizada havia sido recentemente aberta. Já os produtos obtidos do aldeído cromênico obtido a partir de DMF não tratada, os rendimentos reduziram significativamente, bem como o processo de purificação, como no caso do GPQF-309, foi comprometido.

Outro problema enfrentado foi a baixa solubilidade dos compostos sintetizados, o que contribuiu para a diminuição significativa no rendimento dos mesmos, bem como dificultaram a caracterização de alguns deles.

Com relação aos resultados biológicos, infelizmente, os compostos não apresentaram boas atividades antitumorais como desejado.

Os estudos frente às células HEL demonstraram que os compostos não apresentaram qualquer atividade em faixa de concentração variando de 1,56 e 25 µg/mL. Já considerando-se os ensaios frente aos macrófagos J774, alguma atividade biológica, ainda que bastante modesta, pode ser observada para os compostos, sendo o melhor representante da série o análogo GPQF-308.

Estes estudos foram realizados com o objetivo de se compreender se a união de características estruturais de inibidores de JAK (região análogo à da nifuroxazida) e de inibidores de STAT3 (região análoga à do cromeno) levaria a compostos mais ativos (figura 21). São, portanto, estudos preliminares de atividade biológica e, como tais, não foram ensaiadas cepas celulares não tumorais.

Os resultados demonstram, assim, que a junção das características estruturais relacionadas às atividades supracitadas não levou ao efeito desejado. Pelo contrário, o que se observa é uma diminuição da atividade relatada na literatura para a nifuroxazida, a qual exibe ação antitumoral dose e tempo dependente, com valor de  $IC_{50}$  de 4,5 µM frente à células de mieloma múltiplo com STAT3 ativado, linhagem INA<sub>6</sub>.

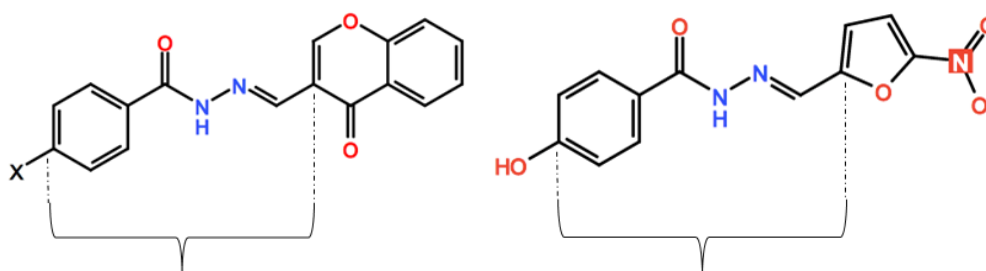


Figura 21: Núcleo comum entre a nifuroxazida e as moléculas do presente trabalho. *N*-acilidrazonas cromênicas a esquerda e nifuroxazida a esquerda.



Este resultado inesperado leva a concluir que a modificação na estrutura da NFZ, particularmente focada na substituição do núcleo nitrofurânico pelo núcleo cromênico não foi uma estratégia adequada.

Fatores que poderiam estar envolvidos neste fenômeno seria a perda da capacidade retiradora de elétrons exercida pelo grupo nitro do nitrofurano. O anel cromênico apresenta ressonância semelhante à observada na região equivalente da NFZ, entretanto, a falta de um retirador de elétrons na molécula pode ter afetado fortemente a atividade dos compostos. Outro fator poderia ser a perda de um ponto de aceção de ligação de hidrogênio, também realizada através deste grupo nitro.

De fato, estudos de docking molecular em andamento no laboratório demonstram que o grupo nitro pode ser importante para o comportamento destes compostos quando da interação com a enzima JAK quinase.

Uma outra hipótese a ser considerada é a de que a substituição do nitrofurano pelo cromeno leve a molécula a ser reconhecida pela JAK quinase por meio de um outro sítio de reconhecimento. De fato, quinases apresentam dois potenciais sítios de reconhecimento de ligantes: o sítio do ATP, por meio dos quais se ligam a maioria dos inibidores de quinases conhecidos; e o sítio modulatório da ação quinase, onde se ligam inibidores de quinases mais seletivos e potentes.

De forma complementar, o grupo nitro presente na nifuroxazida aparenta possuir papel importante para a ação dos análogos. Isso pode ser devido à questões como capacidade eletroretiradora do grupo, acceptor de ligação de hidrogênio e até mesmo por impedimento estérico. Entretanto, mais estudos devem ser desenvolvidos para efetivamente comprovar essas hipóteses.

O presente trabalho foi de extrema importância para o Grupo de Pesquisa Químico-Farmacêuticas da UNIFESP (GPQFfesp), visto que os cromenos e suas particularidades sintéticas associadas, bem como os resultados obtidos através das análises biológicas foram utilizados como modelo para projetos subsequentes que estão, no momento, em andamento no laboratório.

Desta forma, os achados explorados neste TCC direcionaram os trabalhos do grupo para a compreensão da importância do grupo nitro para ação destas moléculas, propondo a reflexão de como substituir tal grupo sem alterar sua potencialidade biológica, bem como indicou quais análogos deveriam ser privilegiados na busca de novos ligantes com atividade antitumoral.

Os resultados obtidos por meio deste trabalho foram importantes para o delineamento de novas perspectivas em função do desenvolvimento de novos fármacos. As informações aqui presentes foram importantes para estudos de modelagem molecular utilizando-se, ainda, análogos da nifuroxazida sem, contudo, necessitar do grupo nitro. Novos estudos de modelagem sintética com o objetivo de avaliar a atividade biológica desses novos fármacos e, também, estudos com viés anti-inflamatório pois acredita-se que esses análogos *N*-acilidrazônicos derivados de cromenos possam ser reposicionados e auxiliar na terapêutica anti-inflamatória.

## 7. CONCLUSÃO

Das sete moléculas propostas, cinco delas foram obtidas através das metodologias citadas, caracterizadas conforme as análises estruturais de  $^1\text{H}$ -RMN, IV e espectrometria de massas, e analisadas nos ensaios biológicos de viabilidade celular e citotoxicidade. Os dois compostos que não foram caracterizados e avaliados biologicamente foram o GPQF 304 e o GPQF 309. O GPQF 304 mostrou-se pouco solúvel aos solventes orgânicos disponíveis no laboratório, e o GPQF 309 também não seguiu para as análises descritas por conta da grande quantidade de impurezas presentes na amostra.

Entretanto, os resultados advindos das cinco moléculas obtidas mostram que as modificações propostas não foram eficazes para a ação antitumoral dos compostos, evidenciando que a troca do anel 5-nitrofurânico pelo sistema cromênico foi prejudicial para tal atividade. A perda do sistema nitrado ou do próprio grupo nitro poderia explicar estes achados.

O grupo nitro poderia contribuir para a atividade destes compostos ou por suas características elétron retiradoras ou por sua capacidade de realizar interações com um determinado alvo por meio de interações de hidrogênio.

Este trabalho foi pioneiro do grupo nas pesquisas por novo antitumorais e ajudou a delinear os novos projetos teóricos e práticos que já se encontram em andamento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRE, F.R. Síntese paralela e estudos de relação estrutura-atividade e de toxicidade seletiva de nitroderivados ativos contra *Leishmania* sp.. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia da Sustentabilidade) – Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema.
- ARMAREGO, W.L.F., PERRIN, D. D. Purification of Laboratory Chemicals. **Butterworth-Heinemann**, v. 4, p. 529, 1996.
- ASHRAF, M. A. et al. Synthesis , Characterization and Biological Activity of Schiff Bases. **International Conference on Chemistry and Chemical Process**, v. 10, p. 1–7, 2011.
- CACHIBA, T. H. et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados n-acilidrazônicos. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1566–1569, 2012.
- CHEN, R.J. et al. Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells. **Toxicological Sciences**, v. 104, n. 2, p. 283-293, 2008.
- CONSTANTINESCU, S. N.; GIRARDOT, M. ; PECQUET, C.. Mining for JAK–STAT mutations in cancer. **Trends in biochemical sciences**, v. 33, n. 3, p. 122-131, 2008.
- DUERR, R. H. et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **science**, v. 314, n. 5804, p. 1461-1463, 2006.
- EDWARDS, A. M.; HOWELL, J. B. L. The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr. R. E. C. Altounyan. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 30, n. 30, p. 756–774, 2000.
- ELLIOTT, J.; JOHNSTON, J. A. SOCS: Role in inflammation, allergy and homeostasis. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 8, p. 434–440, 2004.
- ELLIS, G. P. Chromenes, chromanones, and chromones. John Wiley & Sons, United Kingdom. 2009.1196 p.
- FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective. **Drug discovery today**, v. 21, n. 10, p. 1699-1710, 2016.
- FLETCHER, S. et al. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, n. 6, p. 825–833, 2009.
- FONTES, C. A. S. ALVIM, N. A. T. A relação humana no cuidado de enfermagem junto ao cliente com câncer submetido à terapêutica antineoplásica. **Acta Paul Enferm**, v. 21, n. 1, p. 77-83, 2008.
- FURQAN, M. et al. STAT inhibitors for cancer therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 6, n. 1, p. 90, 2013.
- GASPAR, A. et al. Chromone : A valid scaffold in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, v. 114, n. 9, p. 4960–4992, 2014.
- GKOUVERIS, I. et al. STAT3 signaling in cancer. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, n. 08, p. 709, 2015.

- GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev bras cancerol**, v. 51, n. 3, p. 227-34, 2005.
- HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4, p. 413-421, 2002.
- HAREL, D. et al. Natural Product Derived Antiprotozoal Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure – Activity Relationships of Novel Chromene and Chromane Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 7442-7448, 2013.
- HSU, L.; ARMSTRONG, A. W. JAK inhibitors: treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.
- INAGAKI-OHARA, K. et al. SOCS, inflammation, and cancer. **Jak-Stat**, v. 2, n. 3, p. e24053-1- e24053-10, 2013.
- IVASHKIV, L. B.; HU, X. The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis: pathogenic or protective?. **Arthritis & Rheumatology**, v. 48, n. 8, p. 2092-2096, 2003.
- KAMRAN, M. Z. et al. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1-15, 2013.
- KERI, R. S. et al. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 340-374, 2014.
- LIANG, Y. et al. SOCS signaling in autoimmune diseases: Molecular mechanisms and therapeutic implications. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 5, p. 1265-1275, 2014.
- MÜLLER, J. et al. Discovery of chromone-based inhibitors of the transcription factor STAT5. **Chembiochem**, v. 9, n. 5, p. 723-727, 2008.
- NELSON, E. A. et al. Nifuroxazide inhibits survival of multiple myeloma cells by directly inhibiting STAT3. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 5095-5102, 2008.
- O'SHEA, J. J. Targeting the Jak/STAT pathway for immunosuppression. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. suppl 2, p. ii67-ii71, 2004.
- O'SHEA, J. J. et al. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. suppl 2, p. ii111-ii115, 2013.
- O'SHEA, J. J.; PLENGE, R. JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 542-550, 2012.
- PAGE, B. D. G. et al. Small Molecule STAT5-SH2 Domain Inhibitors Exhibit Potent Antileukemia Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 1047-1055, 9 fev. 2012.
- PFITZNER, E. et al. The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 23, p. 2839-2850, 2004.
- RANDO, D. G. et al. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 14, p. 6724-6731, 2008.
- RANDO, D. G. et al. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 3, p. 557-560, 2002.
- ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910-1939, 2007.

- SHARIF, M. et al. IFN- $\alpha$  priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6476-6481, 2004.
- SHUAI, K.; LIU, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 11, p. 900-911, 2003.
- SILVA, G. A. et al. Modos de vida entre pessoas que tiveram câncer no Brasil em 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 379-388, 2016.
- SIVEEN, K. S. et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-reviews on cancer**, v. 1845, n. 2, p. 136-154, 2014.
- SZTANKE, K. et al. An insight into synthetic Schiff bases revealing antiproliferative activities in vitro. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3648-3666, 2013.
- THOMAS, N.; ZACHARIAH, S. M.. Pharmacological activities of chromene derivatives: an overview. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 6, n. 2, p. 11-15, 2013.
- TURKSON, J. et al. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45443-45455, 2001.
- VARELLA, P. P. V; FORTE, W.C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.
- WALKER, S. R.; XIANG, M.; FRANK, D. A. Molecular and Cellular Endocrinology Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 616-621, 2014.
- WANG, B. D.; YANG, Z. Y.; LI, T. R. Synthesis, characterization, DNA-binding properties of the Ln(III) complexes with 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde-(4'-hydroxy) benzoyl hydrazone. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n.17, p. 6012-6021, 2006.
- YOSHIMURA, A. et al. SOCS, inflammation, and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 20, p. 1-9, 2012.
- ZHU, Y. et al. Nifuroxazide exerts potent anti-tumor and anti-metastasis activity in melanoma. **Scientific reports**, v. 6, p. 20253, 2016.

## 9. PARECER DA ORIENTADORA SOBRE O APRENDIZADO DA ALUNA

O presente trabalho apresentou-se como uma importante oportunidade de aprendizado à aluna. Envolvendo planejamento racional e síntese de novas moléculas, proporcionou conhecimentos de:

Síntese orgânica

Análises de caracterização estrutural

Preparo de amostras para atividades biológicas

Interpretação de resultados biológicos

Estudos de relação entre estrutura-química e atividade biológica

No que tange à síntese, em particular, a obtenção do aldeído cromênico constituiu-se um desafio a ser vencido pela aluna, que empenhou-se em buscar alternativas sintéticas e de purificação às primeiramente propostas. Permitiu, ainda, a compreensão de reatividades de diferentes compostos químicos e como, por meio de ações práticas, controlar a reatividade dos mesmos.

O oxiclreto de fósforo, um reagente altamente irritante para as vias aéreas superiores, exigiu cuidados extras de manipulação e durante todo o processo reacional, os quais não são usualmente requeridos em síntese orgânica.

Esta mesma reação apresenta mecanismo bastante elaborado, fazendo com que a aluna pudesse rever conceitos de mecanismos reacionais importantes do ponto de vista químico.

A caracterização estrutural colocou-a em contato com várias das análises estudadas ao longo do curso de graduação, assim como as análises biológicas que, embora não executadas pela aluna, foram analisadas sob a supervisão da professora responsável pelos estudos, Profa. Dra. Mariana Lazarini.

Por fim, os resultados inesperados de atividade biológica impulsionaram a aluna a buscar explicações para tais achados, e induziu novos estudos teóricos do grupo.

Assim, considero que o aprendizado envolvido no trabalho foi bastante grande e a aluna, desempenhou seu TCC de forma exemplar, responsável e crítica, como esperado para um aluno finalizando seu curso de graduação.

10. ANEXOS

